

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Maiara Marques da Silva

**Efeito do secretoma de Células Tronco Mesenquimais da derme no
crescimento do pelo de camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6**

Florianópolis

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEP. DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA - BEG
LAB. DE CÉLULAS TRONCO E REGENERAÇÃO TECIDUAL – LACERT

Maiara Marques da Silva

**Efeito do secretoma de Células Tronco Mesenquimais da derme no
crescimento do pelo de camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6**

Trabalho apresentado como requisito para a
conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso II (BIO7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Florianópolis
2017

*Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre
me apoiam e me motivam a seguir em frente.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, por me dar a oportunidade de cursar uma graduação pública e de qualidade.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq, FAPESC, MCTI/INFRA e Ministério da Saúde, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À minha orientadora professora Andréa Gonçalves Trentin, por ter me acolhido e aberto as portas não só do laboratório, mas também para o mundo da pesquisa. Agradeço também por todo o conhecimento que eu recebi nos últimos anos, pela confiança depositada em meu trabalho, e por servir como um exemplo de dedicação.

À minha mentora Talita da Silva Jeremias (Talits), por me mostrar que a verdadeira ciência não se resume aos resultados. Obrigada por toda paciência em me acalmar nos meus momentos de ansiedade, por ter me motivado dia após dia e ter acreditado em mim (com o meu negativismo eu sei que não foi uma tarefa simples). Não há palavras para agradecer todos os seus ensinamentos na carreira profissional e pessoal, tu és o meu maior exemplo.

Às minhas tutoras, Rafaela Grecco Machado e Michele Patrícia Rode, por terem me recebido no laboratório e ajudado enquanto eu ainda estava iniciando como aluna de IC e extensão. Todos os ensinamentos foram fundamentais no meu amadurecimento profissional, agradeço enormemente com muitas saudades.

Aos Professores Ricardo Castilho Garcez e Giordano Wosgrau Calloni, por todos os ensinamentos no laboratório e por serem um exemplo do que é a paixão pela ciência.

Ao Hospital Universitário, aos médicos e aos pacientes que possibilitaram a obtenção das células utilizadas neste trabalho.

Aos educadores, Alberto Lindner, Andrea Rita Marrero, Carlos Pinto, Carlos Roberto Zanetti, Davi Henrique Correia de Codes, Evelise Maria Nazari, Kieiv Resende Sousa de Moura, Patricia de Souza Brocardo, Pedro Fiaschi e Rafael Trevisan, por todo conhecimento e amor à profissão transmitidos.

Agradeço especialmente aos meus pais e irmão, por priorizarem a minha educação e me apoiar nos momentos de decisão. Espero sempre ser motivo de orgulho a todos vocês.

À família LACERT que fazem desde laboratório a minha segunda casa e me possibilitou concretizar amizades que espero levar por toda vida.

À Adriane Cristina Fagundes, por ser a minha dupla inseparável e fazer os meus dias melhores. Obrigada por me apoiar (até com as reclamações) e estar sempre comigo quando eu precisava.

As arianas maravilhosas Priscilla Barros Delben e Camila Acordi da Silva, por me incentivarem na pesquisa e cuidarem de mim. Pri, obrigada por me fazer arriscar colocando as ideias em prática, essa é a verdadeira alma da ciência. Cami, obrigada por transcender seu positivismo com esse sorriso maravilhoso que ilumina todos à sua volta.

À Diana Heck (Dianex ou Lady Di), foi uma honra dividir a bancada contigo e quero agradecer por todas as vezes que ouviu as minhas reclamações, por todos os conselhos e ensinamentos. Agradeço também pelo suporte fotográfico nos experimentos *in vivo* deste trabalho.

À Bianca Luise Teixeira, por sempre auxiliar todos no laboratório e me mostrar a importância do bom planejamento dos experimentos.

As lacertianas Aruana Hansel, Gisele Varela Helena e Debiazi Zomer, pelas palavras motivadoras e apoio na pesquisa.

Ao povinho do Ricardo: Fernanda Stelle (Fefe), Jaqueline Isoppo (Já o que? Queline) e Gabriel Pescador (Fisherman). Obrigada pelos cafés, conselhos e almoços no RU (incluindo finais de semana).

À Alessandra Maria Duarte Barauna, por ter me indicado para a entrada no LACERT e agradeço por partilharmos muito além do curso, mas por ter sido minha companheira de curso, laboratório, estágio, vida e irmãs de piercing.

A Fernando Santos Cabral, amigo que a biologia me trouxe e botânico que admiro.

A Natan Dantas, migo quero te agradecer pelos intervalos no café, baladinhas, bares e desabafos.

Bem-vindo ao vale, quero agradecer aos boys: Matheus Reck (parceiro de laboratório e rolês); Diego Amarante (Dr. e dono de Paris); Felipe Azevedo (Fefo); Anderson Klauck (vizinho e leonino maravilhoso); Gabriel Matos (Microscope Sister), Cairé Barreto (não é do vale, mas está no vale); Gabriel Petry e Juliano Tibola.

A todos os amigos e colegas que me incentivaram na realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

“All we have to decide is what to do with the time that is given us.”

— **J.R.R. Tolkien**

RESUMO

MARQUES, M. **Efeito do secretoma de Células Tronco Mesenquimais da derme no crescimento do pelo de camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6.** Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

A presença de pelos é uma característica determinante dos mamíferos e possui diferentes funções físicas que garantem proteção ao organismo. Sendo formado a partir do folículo piloso, esses mini órgãos são constituídos por estruturas complexas organizadas em múltiplas camadas e precisam passar por um constante processo de regeneração, a fim de manter a sua integridade física. Algumas doenças dermatológicas, como as alopecias, além de inibir o processo de regeneração do folículo piloso, levando a perda de cabelo, também influenciam a qualidade de vida dos pacientes, podendo ser acompanhada por problemas físicos, psicológicos ou sociais. O Minoxidil® e Finasterida® são as únicas opções de medicamentos aprovados e disponíveis comercialmente para o tratamento da perda de cabelo, porém, o seu uso é limitado devido à sua eficácia imprevisível e efeitos colaterais graves. Desta forma, existe a grande necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas alternativas que proporcionem resultados mais eficientes. O presente trabalho buscou avaliar o efeito do secretoma de células tronco mesenquimais (CTM) da derme sobre o crescimento do pelo. Para isso, foram realizados experimentos *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6 monitorados durante 21 dias. Os animais foram separados entre os grupos: naïve, veículo, minoxidil e secretoma. Nos grupos veículo e secretoma foi realizada a inoculação intradérmica do tratamento na região tricotomizada em múltiplos pontos. Já o grupo minoxidil, foi realizada a aplicação da solução minoxidil 2% por via tópica. Os dados obtidos, mostram que o secretoma de CTM da derme induziu a progressão da fase telógena para anágena, resultando no crescimento acelerado do pelo, além de promover significativamente um aumento do comprimento e peso do pelo. Surpreendentemente, o secretoma de CTM demonstrou-se superior ao minoxidil em alguns parâmetros, sendo este um fármaco já estabelecido no mercado no tratamento da calvície e queda de cabelo. O tratamento com o secretoma de CTM tem potencial para ser utilizado como um método terapêutico alternativo para o tratamento de alopecias.

Palavras-chave: Folículo piloso, células tronco mesenquimais, secretoma, crescimento do pelo.

ABSTRACT

MARQUES, M. **Effect of mesenchymal stem cell secretome from the dermis on hair growth of mice (*Mus musculus*) C57BL/6**. Course Conclusion Work - Biological Sciences Course, Federal University of Santa Catarina, 2017.

Hair an important characteristic of mammals, has different physical functions to provide organism protection. Composed by hair follicles (HF), these mini-organs are organized into multiple layers and undergo constant processes of regeneration in order to maintain their physical integrity. Dermatological diseases, such as alopecias, inhibit HF regeneration leading to hair loss, and influencing the quality of patient's life causing physical, psychological or social problems. Minoxidil® and Finasterida® are the only drug options approved and commercially available for hair loss treatment, however, their use is limited due to unpredictable efficacy and serious side effects. Thus, there is a great need to develop alternative and more efficient therapeutic strategies. The present study has evaluated the effects of mesenchymal stem cells (MSC) secretome on hair growth. For this, experiments were performed *in vivo* using C57BL/6 mice monitored for 21 days. Animals were split into four groups: naïve, vehicle, minoxidil and secretome. Vehicle and secretome animal groups were ricotomized and injected intradermally at multiple points. Minoxidil animal group was topically treated with 2% minoxidil solution. Secretome from dermal-MSC promoted progression from telogen to anagen phase resulting in accelerated hair growth and also increasing hair length and weight. Importantly, improved results were obtained compared to minoxidil group. Therefore, MSC secretome represent an alternative therapeutic method for alopecia treatments.

Key words: Hair follicle, mesenchymal stem cells, secretoma, hair growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do FP.....	15
Figura 2 – Ciclo de regeneração e interações no nicho do FP	19
Figura 3 – Fluxograma	26
Figura 4 – Esquema representativo da obtenção do secretoma das CTM.....	27
Figura 5 – Esquema representativo do procedimento cirúrgico e Grupos experimentais	29
Figura 6 – Análise macroscópica do crescimento dos pelos.	31
Figura 7 – Caracterização da obtenção do secretoma.....	33
Figura 8 – Ganho de peso dos animais	34
Figura 9 – Crescimento macroscópico dos pelos	35
Figura 11 – Representação gráfica do peso dos pelos	38
Figura 12 – Efeito do secretoma das CTM no Comprimento dos pelos.....	39
Figura 13 - Hipóteses sobre o mecanismo de ação do secretoma das CTM	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Curva de calibração	28
--------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

Bainha reticular interna – IRS

Bainha reticular externa – ORS

Células-tronco – CT

Células-tronco do folículo piloso – CTFP

Células-tronco mesenquimais – CTM

Dulbecco's Modified Eagle's medium – DMEM

Dihidrotestosterona – DHT

Epiderme interfolicular – IFE

Fator de crescimento epidérmico – EGF

Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF

Fator de crescimento de fibroblastos – FGF

Fator de crescimento semelhante a insulina 1 – IGF-1

Fator de crescimento de queratinócitos – KGF

Fator de necrose tumoral – TNF

Folículos pilosos – FP

Food and Drug Administration – FDA

Indutor angiogênico rico em cisteína 61 - Cyr61

Interleucina – IL

Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual – LACERT

Papila dérmica – PD

Queratina 15 – Krt15

Tecido conjuntivo – TC

Vesículas extracelulares – EVs

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Folículo Piloso.....	14
1.2	Embriogênese do folículo piloso	16
1.3	Ciclo do FP	17
1.4	Alopecias	19
1.5	Células Tronco Mesenquimais	21
2.	JUSTIFICATIVA	24
3.	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo Geral:	25
3.2	Objetivos Específicos:	25
4.	METODOLOGIA.....	26
4.1	Desenho Experimental.....	26
4.2	Obtenção das amostras de pele humana	26
4.3	Cultura de células tronco mesenquimais derivadas da derme humana (CTM)	26
4.4	Obtenção do secretoma das CTM.....	27
4.5	Quantificação de proteínas totais do secretoma pelo método BCA	27
4.6	Análises <i>in vivo</i> do crescimento do pelo	28
4.6.1	Animais	28
4.6.2	Tratamento com o secretoma das CTM	29
4.6.3	Análise macroscópica do crescimento do pelo	30
4.6.4	Análise do peso dos pelos	31
4.6.5	Análise do comprimento dos pelos	31
4.7	Coleta e armazenamento das amostras	31
4.8	Análise estatística	32
5.	RESULTADOS	32
5.1	Caracterização do secretoma das CTM derivadas da derma humana	32
5.2	Os tratamentos aumentaram o ganho de peso dos animais	33
5.3	O secretoma das CTM da derme acelera o crescimento dos pelos em camundongos....	34
5.4	O secretoma das CTM aumentou o peso dos pelos	38
5.5	O secretoma das CTM aumentou o comprimento dos pelos	38
6.	DISCUSSÃO	39
7.	CONCLUSÃO.....	43

REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	48
ANEXOS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Folículo Piloso

A presença de pelos é uma característica determinante dos mamíferos (NALLURI; HARRIES, 2016) e possui diferentes funções que garantem proteção ao organismo. Essas funções incluem a defesa contra choques físicos (JEONG *et al.*, 2008) e os efeitos da radiação ultravioleta, camuflagem, dispersão de suor e gordura, diminuição da perda de calor e percepção ambiental pela sensação tátil (QI; GARZA, 2014). Estas diversas funções podem ser desempenhadas por diferentes tipos de pelos conforme a região e espécie. Em humanos, por exemplo, são definidos dois tipos de pelos (cabelos), sendo estes, terminais longos, grossos e pigmentados, ou *vellus* finos e não pigmentados presentes na maior parte do corpo (OTBERG *et al.*, 2004). Em camundongos, existem quatro tipos de pelos de cobertura, além de estruturas ainda mais especializadas, como as vibrissas, as quais possuem um importante papel sensorial. Essa variedade de tipos reflete uma diversidade de características e também diferentes graus de sensibilidades ambientais (SCHMIDT-ULLRICH; PAUS, 2005).

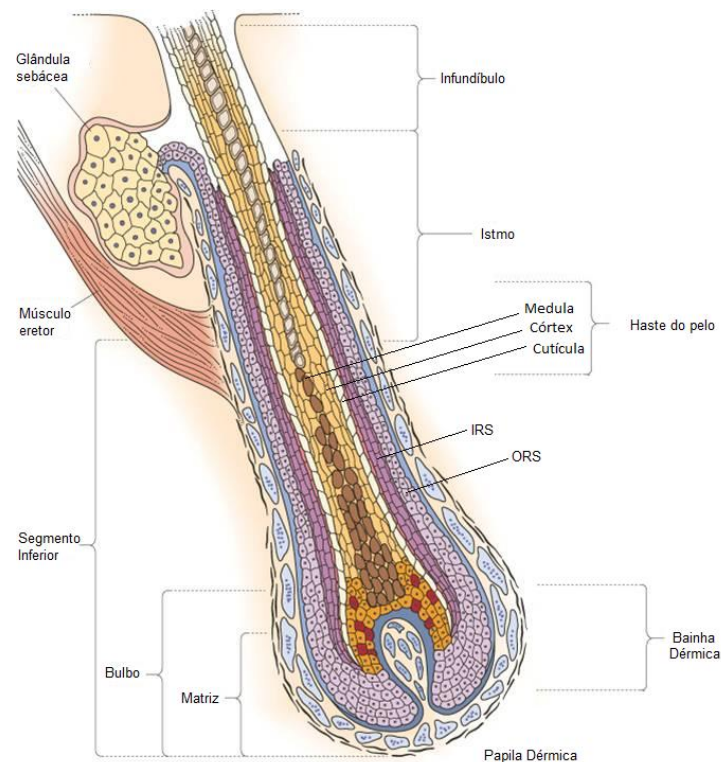
Os pelos são estruturas delgadas e queratinizadas, constituem o folículo piloso (FP), um anexo epidérmico cujo desenvolvimento tem início no período embrionário. Os FP são considerados mini órgãos, constituídos por estruturas complexas organizadas em múltiplas camadas celulares resultantes de interações epidérmico-dérmicas (CAO *et al.*, 2016). Estas camadas são classificadas estruturalmente como bainha reticular externa (ORS, do inglês *outer root sheath*), que está em contato direto com a membrana basal da epiderme; bainha reticular interna (IRS, do inglês *inner root sheath*), formada por três camadas concêntricas de queratinócitos onde se encontra o eixo capilar (pelo) que será projetado através da epiderme (ALONSO; FUCHS, 2003); e a bainha dérmica, uma camada de tecido conjuntivo, a qual envolve a estrutura do FP (Figura 1). O FP é dividido em três regiões, sendo estas o infundíbulo, o istmo e o segmento inferior (Figura 1). Na região inferior, o FP apresenta uma dilatação chamada de bulbo, na qual encontra-se uma matriz germinativa com células relativamente indiferenciadas (germe do folículo) de rápida proliferação e que se diferenciam para formar a raiz do pelo (BALAÑÁ, 2015). Na região do bulbo, está localizada também a papila dérmica (JI *et al.*, 2017) (Figura 1), uma estrutura formada por células mesenquimais com ação crucial na regeneração do folículo piloso.

Outra estrutura importante para a regeneração do folículo piloso, denominada de bulge, está localizada na ORS em um pequeno nicho logo abaixo da glândula sebácea e próxima ao local de inserção do músculo eretor do pelo (JI *et al.*, 2017). O bulge é um reservatório de

células-tronco (CT) e proporciona um microambiente espacialmente distinto para a manutenção e função das CT epiteliais e de melanócitos, que permanecem protegidas por uma coluna de células na parte superior do folículo piloso, bem como, pelo próprio eixo do cabelo queratinizado. As células do bulge são quiescentes na ausência de estímulos e expressam uma assinatura exclusiva de genes (EVERTS, 2012). Um grande número de marcadores tem sido descritos para estas células, tais como a alta expressão de CD34, Lgr5, Queratina 15 (Krt15) (EVERTS, 2012), integrina $\alpha 6$ (BLANPAIN *et al.*, 2004) e proteínas transportadoras de membrana ABCG (TUMBAR *et al.*, 2004).

Figura 1 – Estrutura do FP

Imagem ilustrativa da morfologia do FP. O eixo capilar é composto por três camadas: a medula, o córtex e a cutícula. O eixo do pelo é envolvido pela bainhas reticulares interna (IRS) e externa (ORS), a IRS é formada por camadas concêntricas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação. Ao redor da ORS, por sua vez, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo (TC), a qual envolve a estrutura do FP como um todo (HABIF, 2016). As estruturas associadas ao folículo piloso incluem o músculo eretor do pelo (sua contração eleva o pelo para uma posição mais vertical), glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (JI *et al.*, 2017). Adaptado de HABIF, Thomas P., 2014.



1.2 Embriogênese do folículo piloso

Os seres humanos nascem com aproximadamente 5 milhões de FP e nenhum folículo novo é gerado após o nascimento (QI; GARZA, 2014), por esse motivo as questões da morfogênese folicular permanecem um paradigma no meio científico. A formação dos apêndices cutâneos requer uma variedade de processos morfogenéticos complexos, resultantes de uma sequência altamente coordenada de interações e cooperações bidirecionais entre o mesênquima dermal (papila dérmica) e o epitélio ectodermal (CT do bulge) (BALAÑÁ, 2015).

As interações epitélio-mesenquimais (SCHMIDT-ULLRICH; PAUS, 2005) resultam na formação de pequenas invaginações epidermais na derme, sob as quais se formam espessamentos de células dermais denominados de placóides (OHYAMA; VERAITCH, 2013). Nos mamíferos, a primeira indicação de que um placóide vai se formar em um determinado local, é a agregação de células na camada basal da epiderme. Essa agregação é dirigida pelos fibroblastos dérmicos subjacentes e ocorre em tempos e locais diferentes no embrião.

Uma vez formados os placóides, as células epidérmicas tornam-se altamente proliferativas e se aprofundam na derme, dando origem ao germe folicular. Assim, as células epidermais que alcançam a derme irão formar a matriz epitelial e os agregados dermais (placóides) constituirão a papila dérmica. Nesta mesma etapa, os sinais do mesoderma condensado induzem as células epiteliais foliculares a entrar em uma série de processos de diferenciação e formam a estrutura tubular da IRS que resulta no eixo do pelo queratinizado (GILBERT, 2010) ao redor da qual se mantém uma camada de células em contato com a lâmina basal, formando a ORS (BALAÑÁ, 2015).

Além das estruturas formadas pelo ectoderma e mesoderma subjacente, o FP também é composto por precursores melanocíticos derivados das células da crista neural (CN) que darão origem à unidade de pigmentação. Estas células produzem melanina e entram em contato com queratinócitos adjacentes para distribuir grânulos de pigmento ao longo da pele e cabelo (MOHAMMADI *et al.*, 2016).

A morfogênese é a fase temporária inicial da produção dos eixos capilares, que fornece a arquitetura celular que incluirá um importante nicho de CT: o bulge. No final da morfogênese, as células tronco do folículo piloso (CTFP) localizadas no bulge, completam a maturação e entram em quiescência. A transição da morfogênese para o estágio adulto, no qual os FP se regeneram de forma cíclica, é iniciada pela ativação e proliferação das CTFP (OSORIO *et al.*, 2008).

1.3 Ciclo do FP

Os FP precisam passar por um constante processo de regeneração, a fim de reparar danos, substituir células senescentes e manter a sua integridade física (FUCHS, 2007). Este processo inclui ciclos de repouso e regeneração do FP e é conduzido pelas CT localizadas no bulge (ALONSO; FUCHS, 2003), células do germe (HSU; LI; FUCHS, 2014) e da papila dérmica. Nos mamíferos, o ciclo de regeneração do FP compreende três estágios: fases de crescimento (anágena), regressão (catágena) e quiescência (telógena) (Figura 2A) (CAO *et al.*, 2016). Os ciclos são simultaneamente orquestrados na pele, e em camundongos jovens levam cerca de três semanas para completar um ciclo completo (OSORIO *et al.*, 2008). Em média, um FP pode submeter-se de 10 à 30 ciclos, em uma contínua regeneração, crescendo e perdendo o eixo capilar (SCHLAKE, 2007).

A fase anágena compreende a etapa de crescimento do FP, com intensa atividade mitótica (QI; GARZA, 2014) e representa a fase mais longa e prevalente do ciclo, com duração média de três anos em humanos. Cascatas de sinalizações celulares levam à proliferação e regeneração do pelo através da diferenciação e proliferação das células de amplificação transitória localizadas no segmento inferior do FP (FUCHS, 2007). A duração deste período determina o comprimento do cabelo, sendo diretamente dependente da contínua proliferação e diferenciação das células de amplificação.

O processo de diferenciação, principalmente do eixo capilar e da IRS, é lento, pois exige a reorganização das células proliferativas. As células tornam-se fisicamente reticuladas pelo processo de queratinização celular, que confere ao eixo do cabelo alta resistência à tração e flexibilidade. A IRS também é queratinizada, trazendo rigidez para suportar e guiar o eixo do cabelo durante seu processo de diferenciação (ALONSO, 2006).

A fase catágena é a transição dinâmica entre as fases anágena e telógena. Durante essa fase, a parte cíclica inferior do FP regride em um processo que inclui apoptose de células epiteliais do bulbo e da ORS (ALONSO, 2006). Este processo desloca a papila dérmica para cima até atingir a região superior permanente do FP, onde permanece ancorada e próxima as CT do bulge (FUCHS, 2007). Após a fase catágena, os FP permanecem em repouso, sendo esta fase de inatividade denominada de telógena (QI; GARZA, 2014). Em camundongos, o primeiro período telógeno é curto, durando apenas 1 ou 2 dias. O segundo período, no entanto, dura mais de 2 semanas. A transição da fase telógena para anágena ocorre quando CT quiescentes na base do FP próximos da papila dérmica são ativadas para iniciar um novo ciclo e produzir um novo eixo capilar (ALONSO, 2006).

Neste processo de regeneração, a papila dérmica funciona como um centro de sinalização e contata as CT localizadas no bulge e células do germe folicular. As células da papila enviam sinais moleculares que são processados de maneira sinérgica com aquelas do microambiente do bulge (BLANPAIN *et al.*, 2004), resultando na ativação da proliferação das CT e início da fase anágena de crescimento do pelo (OSORIO *et al.*, 2008). O padrão de sinalização Wnt/ β -catenina é o principal responsável pelo início do ciclo do FP, assim como pelo início da morfogênese do FP (DONG *et al.*, 2015).

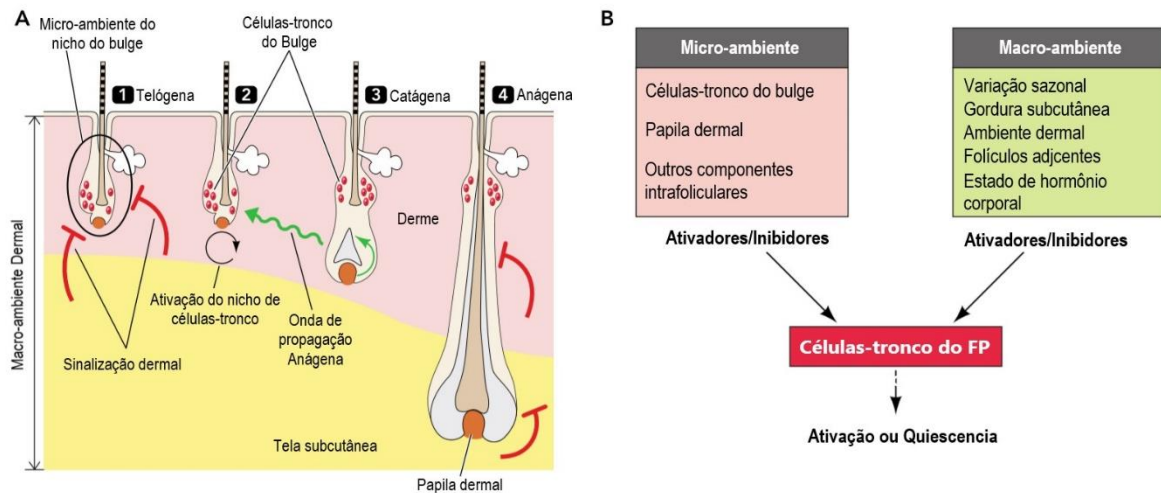
O ciclo do FP representa um modelo notável para estudos sobre a regulação da quiescência (parada reversível do ciclo celular) e ativação de CT, bem como, de proliferação, morte e diferenciação celular na regeneração de um tecido epitelial adulto (ALONSO; FUCHS, 2003). Ambos, progenitores diferenciados e CT coexistem dentro do nicho folicular e, portanto, múltiplos fatores determinam o processo de diferenciação.

Os nichos dos FP são cada vez mais considerados como um paradigma das CT adultas, e estudos neste sistema revelaram propriedades-chave na manutenção da maquinaria regulatória dos nichos de CT em geral (JI *et al.*, 2017). Nesses nichos, o macroambiente é definido como um conjunto de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas extrínsecos ao FP, incluindo os provenientes da derme, do tecido adiposo e hormônios sistêmicos, bem como as influências exercidas a partir do ambiente externo, como variações sazonais na duração do dia e temperatura. Já o microambiente é definido como fatores intrínsecos ao FP, como as CT epiteliais e mesenquimais adjacentes, papila dérmica, entre outros (CHUONG *et al.*, 2012) (Figura 2B).

Tendo em vista este aspecto, as interações entre os macro e microambientes são essenciais para a ativação das células do FP, e conseqüentemente a regeneração do mesmo. Assim, os estudos destas interações são importantes para o entendimento da biologia do FP e estabelecimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de inúmeras doenças associadas ao FP.

Figura 2 – Ciclo de regeneração e interações no nicho do FP

O FP divide-se em uma porção superior permanente e uma porção inferior cíclica, com ciclos de repouso e regeneração do pelo (HSU; LI; FUCHS, 2014). (A) Ilustração das fases de regeneração do FP e ativação das CT foliculares. (B) Influência do macro e microambientes sobre a regeneração do FP. Adaptado de CHUONG, Cheng-Ming. *et al.*, 2011.



1.4 Alopecias

A alopecia é um grupo de doenças dermatológicas comuns que levam a perda de cabelo. Existem várias causas da perda de cabelo, incluindo fatores internos como o envelhecimento, desequilíbrio hormonal (especialmente hormônio masculino excessivo), estresse, deficiência nutricional (YEON A NO, TAE-RIN KWON, HYE MIN PARK, HAE JUNG HAN, HYI JEONG JI, 2015) e doenças autoimunes (JEONG *et al.*, 2008). E fatores externos, como a poluição ambiental, efeitos colaterais de drogas e estresse socioambiental (BOISVERT *et al.*, 2017), algumas dessas causas tornaram-se mais problemáticas com o avanço da industrialização (JEONG *et al.*, 2008). Tendo em vista estes inúmeros fatores, a alopecia pode ser classificada em androgenética, areata, cicatricial e difusa.

A alopecia androgenética também é conhecida como a perda de cabelo padronizada ou calvície e representa o tipo mais comum de alopecia herdada entre homens e mulheres (QI; GARZA, 2014). Nesta doença ocorre a miniaturização progressiva dos FP devido a maior absorção e metabolismo da dihidrotestosterona (DHT). A enzima 5 α -redutase faz a conversão hormonal da testosterona em DHT (ARCA *et al.*, 2004), sendo que níveis elevados de DHT ocasionam a calvície. A perda do cabelo ocorre sob a forma de mechas circulares em uma ou várias áreas na zona do couro cabeludo (ZHU *et al.*, 2017). Além disso, sua prevalência e gravidade aumentam com o avanço da idade (ALDHALIMI; HADI; GHAFIL, 2014).

Diferentemente, a alopecia areata é uma imunodeficiência mediada por células T (JIMURA *et al.*, 2017), com desenvolvimento imprevisível e na qual ocorre a inflamação dos tecidos que compõem o folículo piloso não permitindo a cicatrização (NALLURI; HARRIES, 2016). Ainda não é conhecido se esta inflamação é desencadeada por fatores dérmicos ou pela disseminação de células imunes (CHUONG *et al.*, 2012). Já a alopecia cicatricial, é caracterizada pela má-formação, dano ou destruição dos folículos pilosos (NALLURI; HARRIES, 2016). Neste caso, a perda de cabelo pode ser irreversível (NAMAZI, 2003), fazendo com que a pele atrofie e as aberturas foliculares desapareçam. Tais casos são categorizados como alopecias cicatriciais permanentes (QI; GARZA, 2014).

A alopecia difusa é uma anormalidade do ciclo do FP que resulta em excesso de folículos na fase telógena (repouso) (LIYANAGE; SINCLAIR, 2016). A fase aguda da doença geralmente não é perceptível, pois cerca de 50% dos cabelos geralmente são perdidos antes de haver uma aparente redução da densidade (GORDON; GORDON; TOSTI, 2011). As possíveis causas da alopecia difusa aguda incluem doenças sistêmicas, drogas, febre, estresse psicoemocional, perda de peso, parto, deficiência de ferro, falta de vitamina D, distúrbios inflamatórios do couro cabeludo e interrupção de contraceptivos orais. A determinação da cronologia do início e da duração da perda de cabelo é útil para o tratamento, pois a alopecia difusa de início abrupto provavelmente estará relacionada a um evento desencadeador específico (LIYANAGE; SINCLAIR, 2016).

Tendo em vista os diferentes tipos de alopecias e suas consequências, pode-se considerar que a perda de cabelo é uma condição que influencia significativamente na qualidade de vida dos pacientes (HUNT; MCHALE, 2007), podendo ser acompanhada por problemas físicos, psicológicos ou sociais (YEON A NO, TAE-RIN KWON, HYE MIN PARK, HAE JUNG HAN, HYI JEONG JI, 2015). No quadro de autoimagem distorcida dos pacientes, muitos sofrem pela falta de autoestima e podem exibir sintomas de ansiedade e depressão (NALLURI; HARRIES, 2016). Assim, para auxiliar no problema da regeneração capilar, são desenvolvidas pesquisas buscando estratégias terapêuticas focadas no crescimento e proteção contra a queda do cabelo, como por exemplo, o desenvolvimento de produtos cosméticos e farmacêuticos (ZHANG *et al.*, 2016b).

Os principais medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e que estão disponíveis comercialmente para o tratamento da perda de cabelo são o Minoxidil® e a Finasterida® (BOISVERT *et al.*, 2017). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também aprova estes produtos, bem como, suplementos vitamínicos e minerais para evitar a queda de cabelo.

O Minoxidil® foi introduzido no início da década de 1970 como um vasodilatador para o tratamento da hipertensão, porém foi observado como efeito colateral o aumento da pilosidade e regeneração dos FP nos pacientes. Isso levou ao desenvolvimento de uma formulação tópica em concentração 5% de Minoxidil® para o tratamento de alopecia androgenética em homens (ARCA *et al.*, 2004) e, posteriormente, em mulheres (GUPTA; FOLEY, 2014). O Minoxidil® é um produto derivado de pirimidina (2,4-diamino-6-piperidinopirimidina-3-óxido) (ZHANG *et al.*, 2016b) e seu efeito vasodilatador é ocasionado pela ação agonista de abertura dos canais de potássio nas células do músculo liso, o que diminui a contratilidade (ALDHALIMI; HADI; GHAFIL, 2014). Entretanto, apesar de muita pesquisa, ainda permanece desconhecido o mecanismo exato pelo qual o Minoxidil® estimula o crescimento do cabelo (MESSENGER AG, 2004). Nesse sentido, trabalhos recentes têm sugerido que o Minoxidil® prolonga a fase anágena do ciclo do FP e atua no aumento do tamanho e diâmetro do cabelo (ARCA *et al.*, 2004). Já o modificador hormonal Finasterida®, é um 4-azastereóide sintético de uso oral, análogo à testosterona, que atua como inibidor da enzima 5 α -redutase tipo II presente nos folículos pilosos e órgãos reprodutores masculinos (ARCA *et al.*, 2004). Esta enzima ativa faz a conversão da testosterona em DHT que em altos níveis ocasiona a queda de cabelo.

O uso do Minoxidil® e Finasterida® é limitado devido à sua eficácia imprevisível e a retomada da perda de cabelo após a interrupção do tratamento (ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, ambos os produtos têm efeitos colaterais graves, tais como o ganho de peso, edema, angina pectoris (dores no peito), e quando usado por mulheres grávidas pode causar a malformação do feto. Em homens pode ocasionar também hipogonadismo sob efeito da Finasterida®, originando efeitos colaterais secundários como perda de libido e disfunção erétil, podendo inclusive levar à infertilidade (BOISVERT *et al.*, 2017).

Atualmente, existem poucas abordagens promissoras para o tratamento da queda de cabelo, sendo o Minoxidil® e Finasterida® as principais opções de terapias medicamentosas disponíveis. O transplante autólogo de unidades foliculares é uma opção cirúrgica confiável, mas o número de FP do doador é limitado (DONG *et al.*, 2015). Portanto, existe a grande necessidade do desenvolvimento de estratégias alternativas e inovadoras que proporcione uma otimização terapêutica com resultados mais eficientes (SHAH *et al.*, 2017).

1.5 Células Tronco Mesenquimais

As células tronco são células indiferenciadas que apresentam como características a alta capacidade de proliferação, autorrenovação, diferenciação em linhagens celulares especializadas e regeneração dos tecidos. Essa capacidade é dependente da origem e

potencialidade das CT, podendo ser isoladas e caracterizadas a partir de tecidos embrionários, fetais ou adultos (SANDERS *et al.*, 2006). Nos tecidos embrionários, as CT podem ser classificadas conforme o estágio de desenvolvimento, sendo que as CT totipotentes são encontradas até o estágio de mórula e possuem a capacidade de originar todos os tecidos do organismo incluindo anexos embrionários, enquanto as CT pluripotentes são derivadas da massa interna do blastocisto e têm a capacidade de originar células dos três folhetos embrionários. Em tecidos fetais e adultos são encontradas CT multipotentes que possuem potencial de diferenciação mais restrito, contribuindo para a produção de algumas linhagens celulares específicas (DEANS; MOSELEY, 2000).

As CT adultas são as responsáveis pela renovação, reparo e remodelagem dos tecidos. A capacidade destas células de ajustar suas taxas de proliferação e diferenciação conforme a necessidade dos tecidos nos quais residem é um ponto central para a manutenção da homeostase dos órgãos (CHACÓN-MARTÍNEZ *et al.*, 2017).

As células tronco mesenquimais (CTM) são CT adultas caracterizadas por apresentar morfologia fusiforme, aderência ao plástico, alta taxa proliferativa e pela habilidade de se diferenciar em tipos celulares especializados (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007), como osteoblastos, adipócitos, condrócitos e mioblastos (SANDERS *et al.*, 2006). Além disso, as CTMs apresentam perfil de marcadores positivos para CD29+, CD44+, CD71+, CD73+, CD105+, CD90+, CD166+ e negativos para marcadores hematopoiéticos CD45-, CD14-, CD34-, CD133- e HLA-DR- (DOMINICI *et al.*, 2006). A primeira descrição de CTM foi na medula óssea, porém, atualmente, estas células já foram isoladas a partir de diversos tecidos, como gordura, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico, placenta, polpa dentária, tendões, pele e músculo esquelético, incluindo a região perivascular (ULLAH; SUBBARAO; RHO, 2015). Tendo em vista essa variedade de tecidos em que já foram isoladas CTM, sugere-se que esse tipo celular esteja presente em todos os tecidos e órgãos pós-natais (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

A existência de CTM nos tecidos adultos é suportada pelos microambientes especializados, denominados nichos. Estes são compostos por células vizinhas, matriz extracelular e fatores de sinalização derivados desses compartimentos, porém, a complexidade e integração destes elementos ainda não são bem estabelecidas (SCADDEN, 2006). O nicho ajusta o comportamento das CTM às necessidades do organismo, o que sugere que o nicho instrui a reprogramação de CT e progenitores comprometidos, para restringir a expansão excessiva das células no tecido circundante e evitar a sua depleção (CHACÓN-MARTÍNEZ *et al.*, 2017).

O fato das CTM manterem a capacidade de se diferenciar em linhagens celulares especializadas *in vitro*, apresentarem relativa facilidade de obtenção e expansão em cultura, baixo risco imunogênico e tumorigênico, além de serem naturalmente recrutadas pelo organismo para reparar tecidos danificados (ELISSEEFF *et al.*, 2005) fazem das CTM uma promissora fonte de CT para a medicina regenerativa e terapia gênica (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). As terapias celulares que usam CTM têm a flexibilidade de serem aplicadas de forma autólogas, a partir de amostras do próprio paciente, ou alogênicas, a partir de um banco de células (ELISSEEFF *et al.*, 2005). Entretanto, estudos têm relatado que, de modo geral, as CTM apresentam baixa sobrevivência no ambiente lesionado após sua inoculação. Desta forma, acredita-se que a sinalização parácrina seja o provável mecanismo de atuação das CTM no reparo tecidual, atuando pela alteração do microambiente a partir da secreção de fatores tróficos.

O secretoma é definido como o conjunto complexo de moléculas liberadas por células do organismo destinadas à diversas funções biológicas (DEANS; MOSELEY, 2000). No secretoma são encontrados grupos importantes de moléculas, que incluem um conjunto diverso de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas e proteases da matriz extracelular (CHEN *et al.*, 2008), além de hormônios, e até mesmo, mediadores de lipídios e material genético (KATSUDA *et al.*, 2013). As moléculas secretadas estão envolvidas numa variada gama de processos biológicos, incluindo o recrutamento de células vizinhas, morte celular, proliferação, hematopoiese, angiogênese, propriedades imunomoduladoras e a organogênese (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

As CTM secretam estas moléculas através de mecanismos clássicos e não clássicos, incluindo translocação proteica, exocitose e encapsulamento por vesículas ou exossomos. A maioria das proteínas secretadas contém peptídeos de sinalização amino-terminais ou internos que direcionam a sua triagem para o retículo endoplasmático da célula. Do retículo endoplasmático, as proteínas são transportadas para o espaço extracelular, podendo ser transportadas através de vesículas (NICKEL; RABOUILLE, 2009). O conteúdo molecular das vesículas inclui proteínas, mRNAs e miRNAs, que mimetizam, em parte, suas células de origem (KATSUDA *et al.*, 2013). Atualmente, cogita-se que as vesículas secretadas das CTM podem ter um papel de maior importância do que promover a diferenciação dessas células (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007), em razão do transporte de uma série de moléculas de sinalização para alvos celulares distantes (KATSUDA *et al.*, 2013).

Estudos recentes mostram que o secretoma das CTM influencia o crescimento, replicação, diferenciação e adesão celular, sendo desta forma, o principal responsável pela comunicação intercelular (CHEN *et al.*, 2008). Em lesões, os fatores secretados pelas CTM

atuam primariamente na redução da inflamação e no aumento da angiogênese, e tem como efeito a regulação da sobrevivência, indução da proliferação e migração celular e detecção da expressão gênica de outras células no ambiente lesionado (SCADDEN, 2006). Especificamente no folículo piloso, as proteínas da família Wnt e, moduladores solúveis como Notch, FGFs e Hedgehog contribuem com a sinalização parácrina, tendo a capacidade de induzir a proliferação e diferenciação das células do folículo piloso (D'SOUZA *et al.*, 2015).

Além disso, essas funções do secretoma de CTM vem sendo progressivamente aprimoradas por modificação celular em abordagens de terapia genética, promovendo o reparo tecidual de maneira mais direcionada (D'SOUZA *et al.*, 2015). O secretoma pode ser modificado para transportar genes terapêuticos, servindo como transmissores de moléculas programadas. O secretoma das CTM vem sendo aprimorado para superar as limitações ligadas à injeção direta de proteínas benéficas para o crescimento do pelo (KATSUDA *et al.*, 2013). Em particular, estes fatores modificados podem ser utilizados na necessidade de uma melhor biodisponibilidade da molécula desejada (D'SOUZA *et al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Grandes dificuldades são reportadas na restauração do crescimento dos pelos após lesões na pele e doenças que causam a perda do cabelo, como as alopecias, o que pode comprometer a função protetora destas estruturas que precisam passar por um constante processo de regeneração, a fim de manter sua integridade física (QI; GARZA, 2014). Em busca de potenciais tratamentos para a indução do crescimento dos pelos, as estratégias de pesquisa têm focado na regeneração do FP através da modulação de diferentes moléculas, silenciamento de RNA e o uso da terapia celular, a fim de auxiliar na qualidade de vida dos pacientes.

Tendo em vista estes novos estudos, uma abordagem em potencial no tratamento focado no crescimento dos pelos é a administração do secretoma das CTM. Na literatura muitos trabalhos relatam o importante papel das CTM em manter a homeostase dos órgãos e tecidos, fazendo o suporte do nicho de CT e secretando fatores que influenciam no crescimento do pelo (DEANS; MOSELEY, 2000). Tendo em vista os resultados positivos relatados, o secretoma de CTM da derme surge como uma nova alternativa terapêutica na perda de cabelo, ainda não reportada na literatura, são projetados resultados positivos devido à sua ação direcionada e justifica-se menores riscos associados ao secretoma, pois a terapia livre de células evita problemas relacionados com a incompatibilidade imunológica, tumorigenicidade e a transmissão de infecções associadas às células. Além disso, o secretoma de CTM possibilita

ainda a sua produção em grandes quantidades disponíveis, podendo ser adaptado para aumentar ou diminuir a sua resposta sob efeitos específicos (TRAN, 2015).

Desta forma, o presente trabalho busca desenvolver conhecimentos a respeito da ação do secretoma de CTM da derme sobre o folículo piloso, buscando compreender seu efeito sobre o processo de regeneração e crescimento do folículo piloso em modelo murino. Além disso, este trabalho tem o potencial de motivar novos estudos que tenham como objetivo elucidar os mecanismos que envolvem estes processos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a ação do secretoma das CTM derivadas da derme humana no crescimento dos pelos em camundongos (*Mus musculus*).

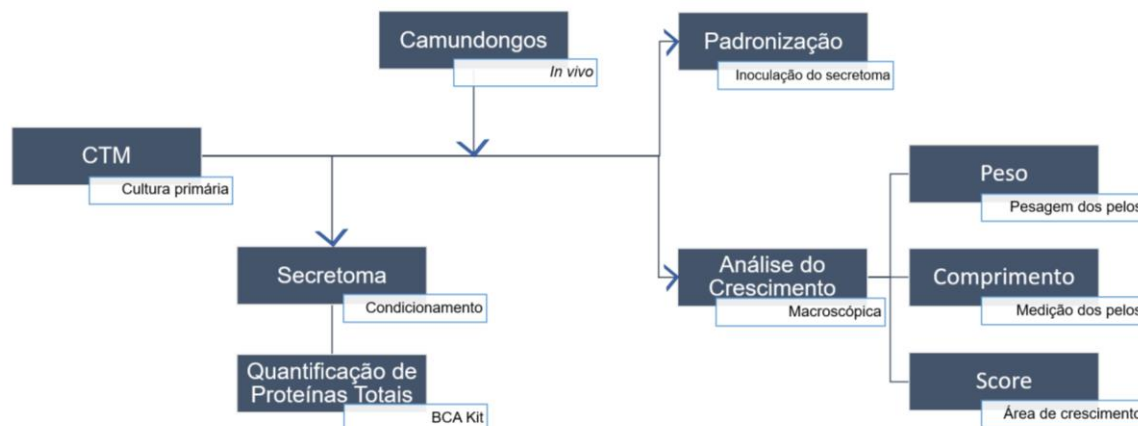
3.2 Objetivos Específicos:

- Obter e caracterizar o secretoma das CTM derivadas da derme humana;
- Estabelecer o método de injeção intradérmica do secretoma das CTM em camundongos;
- Avaliar a alteração do peso em camundongos após o tratamento;
- Avaliar macroscopicamente o crescimento do pelo em camundongos tratados com o secretoma das CTM;
- Avaliar o peso dos pelos crescidos na região tratada com o secretoma de CTM;
- Avaliar o comprimento dos pelos crescidos na região tratada com o secretoma de CTM.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho Experimental

Figura 3 – Fluxograma



Fonte: A autora (2017).

4.2 Obtenção das amostras de pele humana

As amostras de pele da face foram obtidas em colaboração com o Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) localizado em Florianópolis. Os fragmentos de pele provenientes de pacientes submetidos ao procedimento de ritidoplastia (lifting facial) foram coletados mediante a prévia apresentação e assinatura do termo de consentimento pelo paciente (Anexo 1). As amostras foram armazenadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina 1U/μg) e mantidas a 4°C, sendo posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT/UFSC) para realização dos procedimentos de manipulação e cultura celular.

4.3 Cultura de células tronco mesenquimais derivadas da derme humana (CTM)

Os fragmentos de pele foram seccionados em pedaços de 1 cm² e incubados com dispase 12,5 U/mL durante 15 horas, a 4°C. Após a dissociação enzimática, a epiderme, os folículos pilosos e a tela subcutânea foram removidos, obtendo assim apenas o tecido dérmico. Esse foi incubado com tripsina 0,25% e EDTA 0,02% durante 45 minutos, a 37°C. Após este período foi realizado o bloqueio da reação enzimática utilizando DMEM acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF). As células foram filtradas utilizando *cell strainer* com poros de 70 μm (BD), centrifugadas durante 7 minutos a 360 g, suspensas em DMEM acrescido de 10% SBF e antibióticos e mantidas em garrafas de cultura de 25cm². As culturas primárias foram mantidas

em condições de ambiente controlado com temperatura de 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Após 3-4 dias o meio de cultivo foi trocado e as células não aderentes descartadas. As células aderidas (CTMs derivadas da derme) foram mantidas até a cultura atingir confluência de aproximadamente 80%. Após, foram submetidas à repicagem, sendo que neste estudo foram utilizadas culturas na passagem 3.

4.4 Obtenção do secretoma das CTM

Para obtenção do secretoma (Figura 4), as CTM foram cultivadas em placas de 100mm de diâmetro até atingirem confluência de 90%. Após, as CTM foram lavadas com PBS 1X (tampão fosfato-salino) e mantidas em 15mL de DMEM sem SBF durante 48 horas. Após esse período de condicionamento do meio, esse foi coletado, centrifugado a 360 g durante 10 minutos e filtrado com uma membrana de nitrocelulose com tamanho de poro de 0,22 µm. O meio condicionado foi concentrado utilizando o sistema *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane de 10kDa*, conforme descrição do fabricante. Após a obtenção do meio condicionado concentrado, contendo o secretoma das CTM, este foi aliquotado e mantido a -80°C para posterior utilização nos experimentos.

Figura 4 – Esquema representativo da obtenção do secretoma das CTM



Fonte: A autora (2017).

4.5 Quantificação de proteínas totais do secretoma pelo método BCA

Para a quantificação de proteínas totais presentes no secretoma das CTM foi utilizado o ensaio colorimétrico do kit BCA (*Bicinchoninic Acid Assay*, do inglês), conforme especificações do fabricante. O método consiste na reação do ácido bicinonínico (reagente cromogênico) e na conversão dos íons cobre em condições básicas.

Para isso, foi realizada a combinação dos reagentes A e B do kit BCA, adicionando 50 partes do reagente A com 1 parte de Reagente B, suficientes para todos os padrões e amostras. O reagente A é uma solução contendo ácido bicinonínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em NaOH 0,1 N, e o reagente B é uma solução de 4% de sulfato de cobre penta-hidratado - CuSO₄/5H₂O. A preparação da curva de calibração foi utilizado a

proteína albumina como padrão e realizada seguindo as especificações do padrão de diluições do fabricante (Tabela 1).

Tabela 1 – Curva de calibração

<i>Concentração Final (mg/ml)</i>	<i>Volume de um padrão de 1mg/ml (µl)</i>	<i>Volume de água ou tampão de diluição (µl)</i>
0 (branco)	0	100
0.2	20	80
0.4	40	60
0.6	60	40
0.8	80	20
1.0	100	0

Como resultado, se obtém um produto final de cor roxa e a produção de resíduos de aminoácidos e peptídeos. A quantidade de proteínas foi obtida por meio da relação linear com a intensidade da coloração mensurada através do leitor de microplacas *Tecan Infinite M200* no comprimento de onda específico de 562nm. Para esta quantificação foram utilizadas amostras de secretoma de CTMs mantidas no freezer -80°C.

4.6 Análises *in vivo* do crescimento do pelo

4.6.1 Animais

Para avaliar o crescimento do pelo promovido pelo secretoma de CTM, foram realizados estudos *in vivo* utilizando 48 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem isogênica C57BL/6, destes 24 fêmeas e 24 machos, com idade entre 6 a 8 semanas.

Os camundongos foram obtidos por meio de reprodução controlada no biotério setorial do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) – UFSC. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e seguiram as diretrizes brasileiras para o cuidado e a utilização de animais em atividade de ensino ou pesquisa científica de 2016 (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob número de protocolo 3836211016 (Anexo 2).

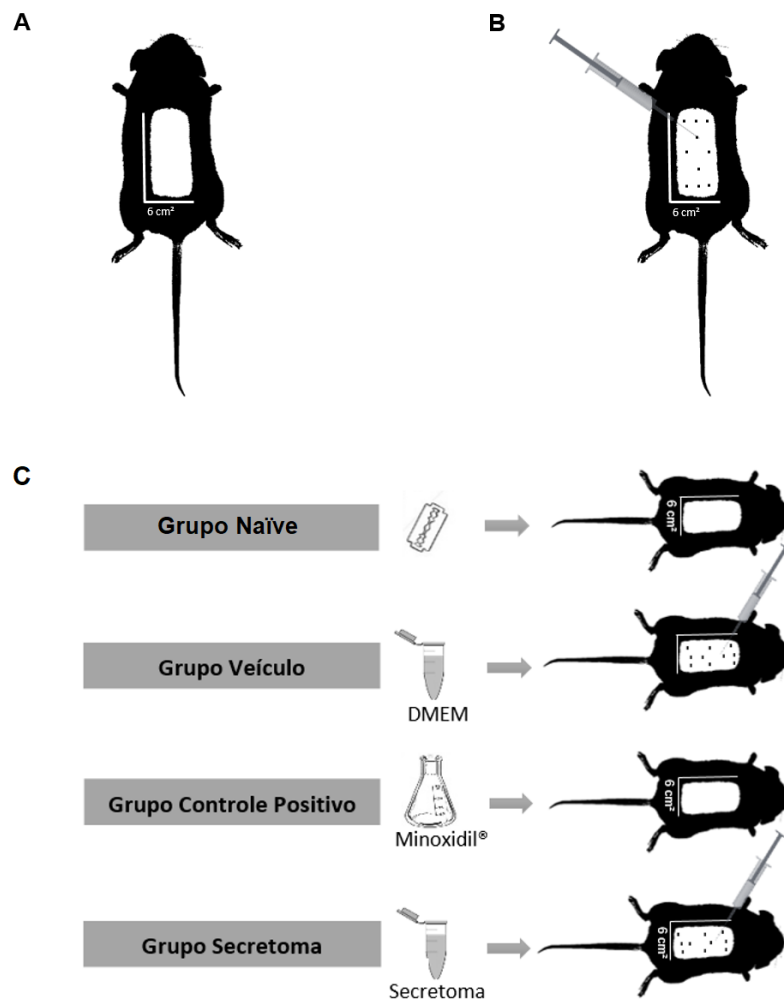
Os animais foram acondicionados separadamente em caixas de plástico com maravalha, mantidos em ambiente de condições controladas de temperatura e umidade, ciclo claro/escuro de 12h, ração sólida e água à vontade.

4.6.2 Tratamento com o secretoma das CTM

Os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), em um volume final de 60 μ L, por via intraperitoneal. O animal foi considerado anestesiado mediante perda de reflexo palpebral e de qualquer reação após estímulo. Após, foi realizada a tricotomia da região dorsal do animal utilizando-se lâmina de barbear, e a assepsia da região com solução de Iodopovidona 10% e álcool 70°GL. A área tricotomizada corresponde a 6 cm² (3 cm x 2 cm), na qual foi realizado o tratamento e análise do crescimento do pelo (Figura 5). Para a realização das análises os animais foram divididos (N=12) nos seguintes grupos experimentais (Figura 5C): **(1) Naïve; (2) Veículo; (3) Secretoma; (4) Minoxidil**.

Figura 5 – Esquema representativo do procedimento cirúrgico e Grupos experimentais

(A) Modelo padrão de tricotomia realizada na área de 6 cm²;
 (B) Modelo de aplicação intradérmica do tratamento em múltiplos pontos;
 (C) Procedimento experimental para a análise do crescimento dos pelos em camundongos.



A aplicação do veículo (DMEM) e do secretoma das CTMs (meio condicionado) foi realizada com auxílio de uma seringa de insulina BD Ultra-Fine (6 mm x 0,3 mm), atingindo a profundidade da derme (intradérmica). Foi aplicado um volume total de 100 uL de meio na região tricotomizada, distribuído em 10 pontos (10µl/ponto), conforme a figura 3B. Anteriormente à inoculação, o secretoma foi descongelado e mantido a 4°C.

Como controle positivo dos experimentos, foi utilizado o tratamento com a aplicação de *Minoxidil*®, já que este é já utilizado comercialmente como promotor do crescimento de pelos/cabelos. A solução de minoxidil® utilizada foi de 5%, sendo diluída em 10% de álcool isopropílico 10% de propileno-glicol e álcool 96° GL. Foram aplicados 100µl dessa solução (via tópica) na região tricotomizada do animal, 3 vezes por semana até o final do tratamento. O crescimento dos pelos dos camundongos foi avaliado durante 21 dias, e após este período foram eutanasiados por inalação de isoflurano (superdose com administração lenta). A fim de verificar se os tratamentos afetam o ganho de peso, os animais foram pesados no início e ao final do procedimento. Não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas sendo analisados conjuntamente.

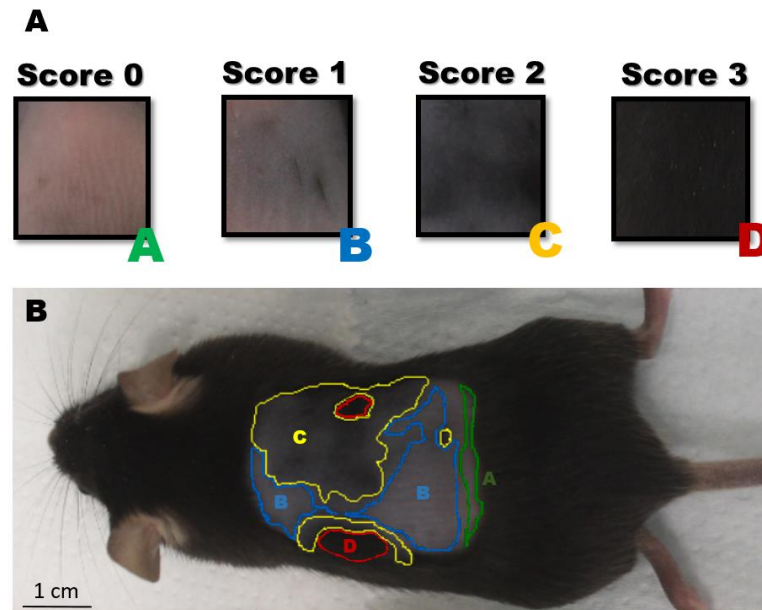
4.6.3 Análise macroscópica do crescimento do pelo

Para a análise macroscópica do crescimento dos pelos, os animais tratados foram anestesiados com isoflurano e fotografados no dia 0, 7, 14 e 21 após o procedimento experimental. Os níveis de crescimento dos pelos foram classificados por *score*, sendo o *score 0* corresponde a pele sem pelos; *score 1*, a pele acinzentada; *score 2*, pelos curtos; e *score 3* o pelos longos (Figura 6). A análise da área de crescimento dos pelos foi realizada através das imagens obtidas utilizando-se o programa *ImageJ*®. As áreas correspondendo aos diferentes *scores* foram mensuradas (Figura 6B), gerando um valor em pixels por centímetro².

Figura 6 – Análise macroscópica do crescimento dos pelos.

(A) Classificação dos *score* conforme o crescimento do pelo;

(B) Delineamento da área de crescimento de pelos conforme o score, através do software *ImageJ*®.



Fonte: A autora (2017).

4.6.4 Análise do peso dos pelos

Para verificar a quantidade de pelos que cresceram na região tricotomizada após 21 dias nos diferentes tratamentos, os pelos desta região (que possuem uma coloração mais escura) foram coletados utilizando-se uma lamina depilatória, acondicionados em microtubos e pesados usando uma balança de precisão.

4.6.5 Análise do comprimento dos pelos

Para análise do comprimento dos pelos, os mesmos foram retirados da pele dos animais com o auxílio de uma pinça e fotografados utilizando o microscópio macro zoom Olympus MVX10. O comprimento dos pelos (5 por animal) foram mensurados utilizando o programa *ImageJ*® e foi realizada uma média das medidas por animal.

4.7 Coleta e armazenamento das amostras

Para análises futuras dos parâmetros histológicos e morfométricos, foi realizada a biópsia do tecido submetido ao tratamento, no dia 21. Parte do tecido da biópsia foi fixado em solução de paraformaldeído 4% por 48 h a 4°C. Em seguida, as amostras fixadas foram mantidas em etanol 70° GL para posterior processamento histológico, a fim de quantificar o

número de folículos pilosos e avaliar a indução do ciclo do folículo piloso, através das diferenças estruturais.

Uma pequena fração da biópsia foi criopreservada em nitrogênio líquido para posterior análise da expressão de genes relacionados com a manutenção do folículo através de RT-PCR.

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Os dados foram, avaliados por *Teste t* independente, comparando o grupo secretoma com os demais grupos. No apêndice 1, foram apresentados os gráficos com as análises estatísticas dos pelos entre os outros grupos. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software estatístico *GraphPad Prism*®.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do secretoma das CTM derivadas da derma humana

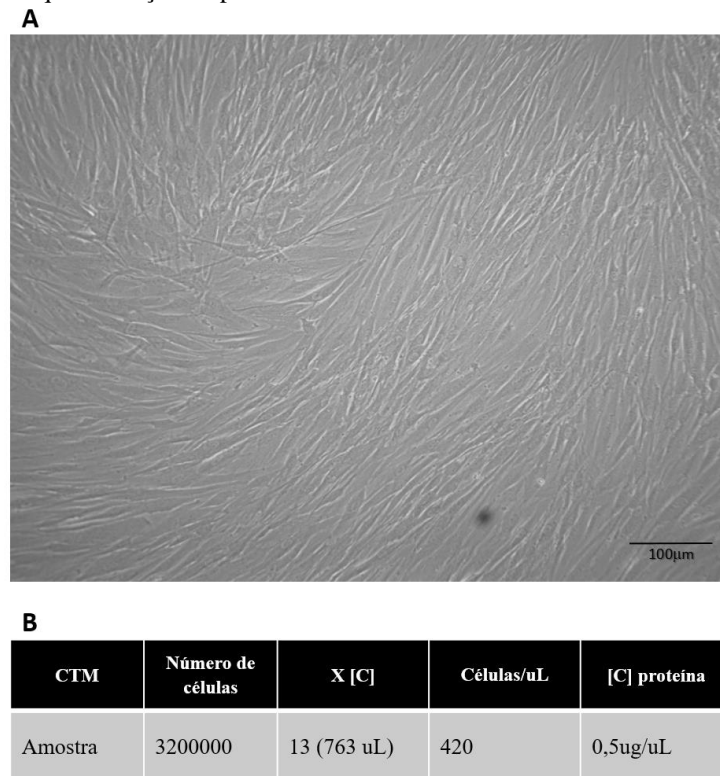
O secretoma das CTM derivadas da pele e sua obtenção foram caracterizados em relação a morfologia das CTM após o procedimento de condicionamento do meio, ao volume total de meio e a quantidade de proteínas obtidos após a etapa de concentração do meio. Os resultados obtidos demonstram que após o procedimento de condicionamento (48 horas de cultivo na ausência de SBF) as CTM isoladas da derme humana mantiveram a sua morfologia fibroblastóide típica, com formato fusiforme (Figura 7). Além disso, não foram observadas células e fragmentos em suspensão, indicando assim que a ausência de SBF não ocasionou morte celular.

O secretoma utilizado neste estudo foi obtido de uma cultura de CTM contendo $3,2 \times 10^6$ (3200000) células, da qual 12 mL de meio condicionado foram coletados e concentrados. Ao final, obteve-se 713uL de meio, tendo assim, um meio condicionado 13 vezes concentrado. A seguir, foi avaliada a concentração [C] de proteínas totais contidas neste meio através do kit BCA (Figura 7B). Os dados obtidos mostram que o meio contém 0,5ug/uL de proteínas. Assim, foi determinada a aplicação de 100 μ l de secretoma por animal.

Figura 7 – Caracterização da obtenção do secretoma.

(A) Morfologia das CTM em contraste de fase após 6 dias de cultivo.

(B) Dados da obtenção e quantificação de proteínas totais do secretoma de CTM.

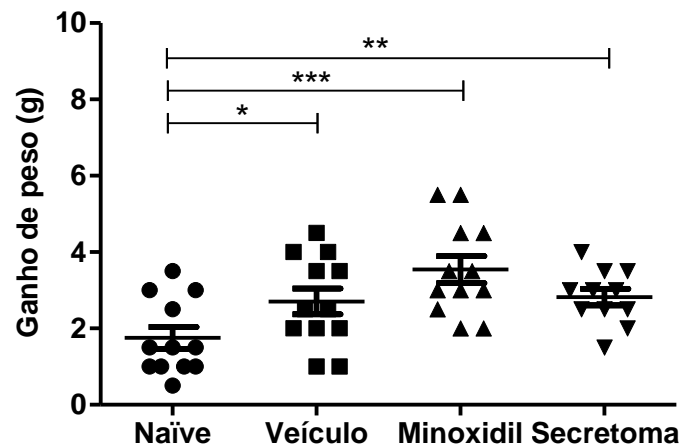


5.2 Os tratamentos aumentaram o ganho de peso dos animais

Os resultados obtidos demonstram que os animais de todos os grupos apresentaram um aumento do peso corporal ao longo do tratamento (Figura 8). Os animais do grupo naïve tiveram o menor ganho de peso (1,75g), enquanto os dos grupos tratados com minoxidil® apresentaram um ganho maior, sendo este de 3,54g. Considerando que o ganho de peso médio de um animal adulto sem passar pelo procedimento é de 2g. Foi observado um aumento significativo de 1,5x, 2x e 1,6x no ganho de peso dos animais do grupo veículo, minoxidil® e secretoma, respectivamente, comparado ao grupo naïve.

Figura 8 – Ganho de peso dos animais

Gráfico representativo do ganho de peso dos animais. Os dados mostram a diferença entre os grupos tratados com relação ao grupo naïve. Os valores representam as médias \pm e erro padrão *P < 0,0419, **P < 0,0078 e ***P < 0,0007 por teste T de *student*.

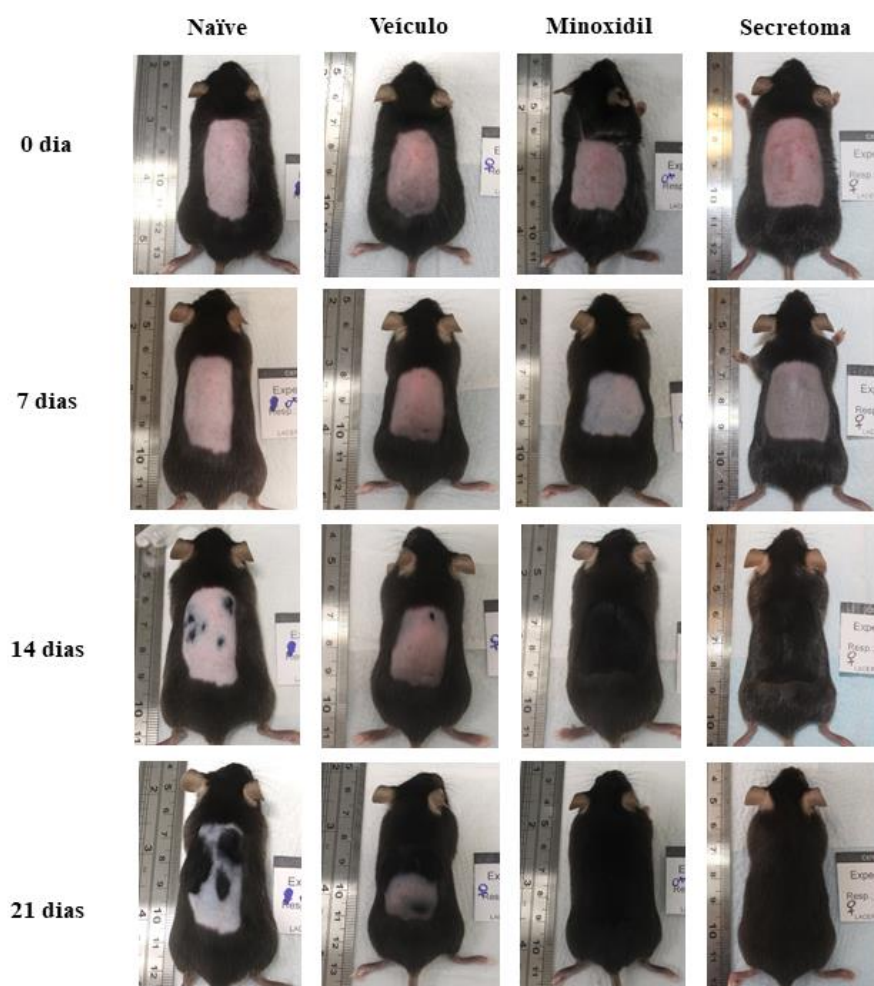


5.3 O secretoma das CTM derivadas da derme acelera o crescimento dos pelos em camundongos

O crescimento do pelo *in vivo* é induzido pela sua raspagem da região dorsal dos animais. No trabalho de Osorio *et al.* a quantificação do efeito do tratamento foi estabelecida através da coloração da pele cinza/preta sendo um indicativo da fase anágena do ciclo e pele rosa indicadora da fase telógena (OSORIO *et al.*, 2008)(OH; PARK; KIM, 2014). Esta padronização também foi utilizada no presente trabalho para a delimitação dos diferentes scores. Assim, para avaliar se o tratamento influencia o crescimento do pelo foi realizada análise da coloração da pele/presença de pelos da região tratada através de quantificação por *score*, onde *score* 0 é representado pela área de pele rosada, o *score* 1 pela área de pele acinzentada, *score* 2 pela área de pelos curtos crescidos e *score* 3 pela área de crescimento com pelos longos. Na figura 9 observa-se o crescimento dos pelos com base nas condições de tratamento, nos dias 0, 7, 14 e 21.

Figura 9 – Crescimento macroscópico dos pelos

Efeito dos tratamentos (Naïve, Veículo, Minoxidil® e Secretoma) no crescimento dos pelos em camundongos C57BL/6, após 7, 14 e 21 dias.



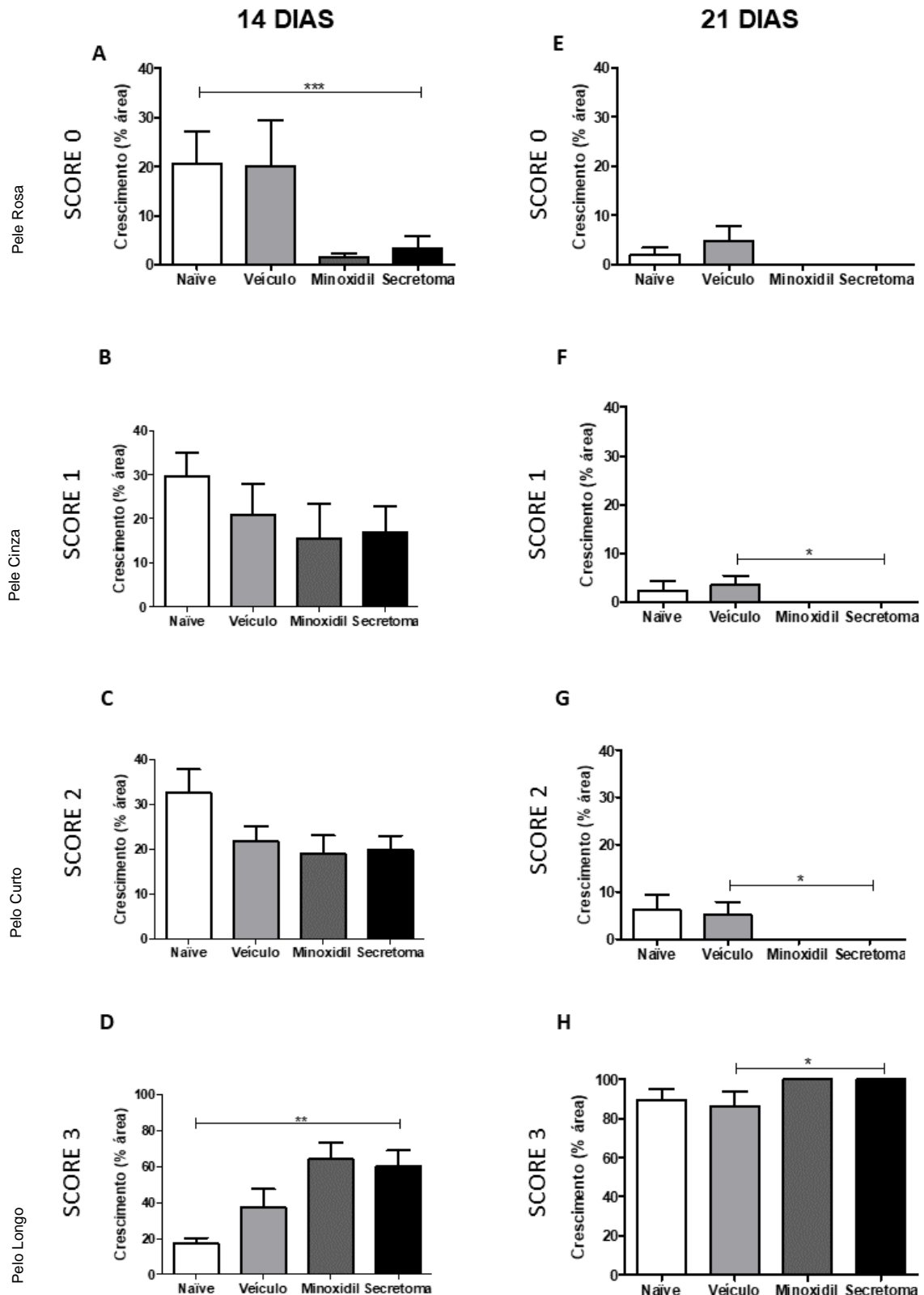
O crescimento mais acelerado dos pelos se deu nos grupos minoxidil® e secretoma (Figura 9). No dia 7, os animais do grupo naïve e veículo apresentavam a pele rosada, enquanto os animais do grupo Minoxidil® e secretoma já apresentavam a pele acinzentada, indicando o crescimento do pelo. Nos dias 14 e 21, foi realizada a quantificação do crescimento do pelo, através de score (Figura 10). Os resultados mostraram que após 14 dias, nos animais do grupo naïve e veículo aproximadamente 20% da área tratada apresenta o score 0 (sem pelo), enquanto os animais do grupo Minoxidil® e secretoma, apresentam apenas 2% e 3%, respectivamente. A porcentagem das áreas representadas pelo score 1 e 2 foram mais homogêneas entre os grupos (Figura 10 - B e C), sendo que no score 1 foram observadas diferenças apenas entre os animais do grupo naïve (30%) e Minoxidil® (15%). Em relação a porcentagem da área representadas pelo score 3 (pelos longos), os animais do grupo secretoma e Minoxidil® apresentam aproximadamente 60%, enquanto os do grupo naïve possuem 17% e o veículo 37%.

No 21º dia de tratamento os animais dos grupos Minoxidil® e secretoma apresentaram crescimento total dos pelos, ou seja, 100% da área tratada apresentava score 3, não sendo observada áreas com outras fases de crescimento do pelo (Figura 10 – H). Diferentemente, os grupos naïve e veículo apresentaram uma heterogeneidade no crescimento, sendo observada ainda áreas sem pelos (score 0) e pelos em crescimento. As áreas que apresentaram score 0, correspondem a 2% no grupo naïve e 5% no veículo, não apresentando diferença entre os grupos. Já as áreas com score 1, foram observados valores próximos no grupo naïve (2%) e veículo (3%). As áreas que apresentaram score 2 nos grupos naïve e veículo foram de 6% e 5%, respectivamente. E as áreas com score 3 correspondem aos valores de 89% no grupo naïve e 86% no grupo veículo. Foram observadas diferenças significativas entre o grupo veículo e secretoma nas áreas com scores 1, 2 e 3.

Estes resultados indicam que o tratamento com o secretoma e Minoxidil® aceleram o crescimento do pelo, quando comparados aos grupos naïve e veículo.

Figura 10 – Porcentagem da área de crescimento dos pelos

Representação gráfica da porcentagem da área de crescimento no *score 0* (A e E), *score 1* (B e F), *score 2* (C e G) e *score 3* (D e H) entre os grupos experimentais no 14° e 21° dia de tratamento. Os dados mostram a diferença entre os grupos. Os valores representam as médias \pm e erro padrão * $P < 0,0141$; ** $P < 0,0028$ e *** $P < 0,0001$ por teste T de *student*.

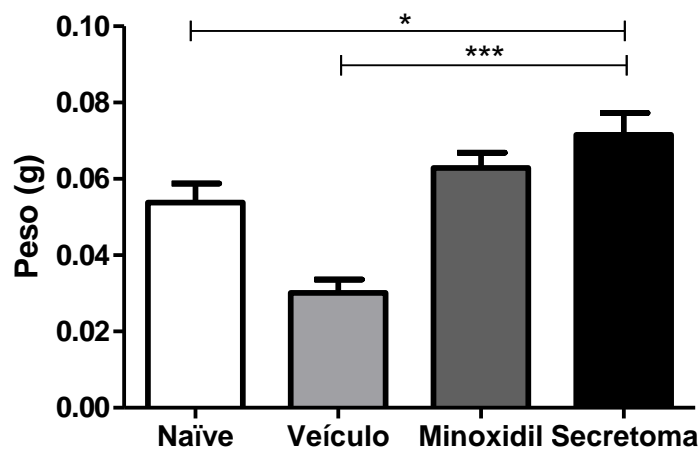


5.4 O secretoma das CTM aumentou o peso dos pelos

Após avaliar a taxa de crescimento de pelos, foi analisado se o tratamento com o secretoma das CTM afeta a quantidade de pelos. Para isso, foi realizada a pesagem dos pelos, após 21 dias de tratamento. Os dados demonstraram um maior efeito do secretoma de CTM sobre o peso dos pelos, tendo um aumento de 40% quando comparado aos animais naïve (0,05g) e 133% quando comparado ao grupo veículo (0,03g). Não foram observadas diferenças significativas entre o peso dos pelos nos animais do grupo minoxidil® (0,06g) e secretoma (0,07g) (Figura 11).

Figura 11 – Representação gráfica do peso dos pelos

Gráfico representativo do peso dos pelos em gramas (g). Os valores representam as médias \pm e erro padrão * $P < 0,0178$ e *** $P < 0,0001$ por teste T de *student*.



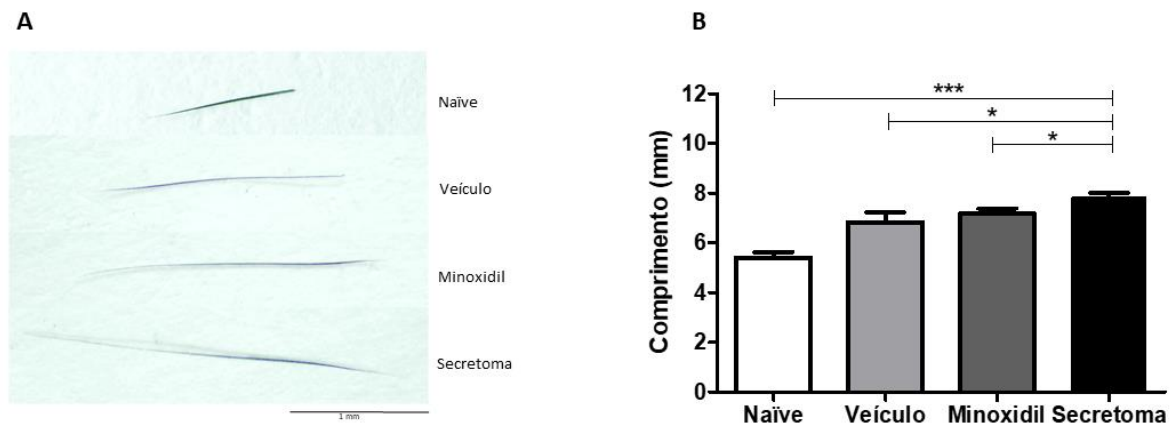
5.5 O secretoma das CTM aumentou o comprimento dos pelos

Para avaliar se o secretoma afeta o tamanho dos pelos, foram realizadas medidas do comprimento. A análise revelou que os animais tratados com o secretoma apresentaram um maior comprimento dos pelos, sendo este em média 7,8 mm (Figura 12 - A). Os dados mostraram um aumento significativo de 40%, 14% e 10% no comprimento dos pelos dos animais tratados com secretoma em relação aos do grupo naïve (5,4 mm), veículo (6,8 mm) e minoxidil® (7,1 mm), respectivamente (Figura 12 - B).

Figura 12 – Efeito do secretoma das CTMs no Comprimento dos pelos

(A) Imagem representativa do tamanho dos pelos nos diferentes grupos de tratamento.

(B) Representação gráfica do comprimento dos pelos em milímetros. Os valores representam as médias \pm e erro padrão * $P < 0,0348$ e *** $P < 0,0001$ por teste T de *student*.



6. DISCUSSÃO

O secretoma de CTM vem sendo descrito como um potente modulador no reparo da pele por e seus efeitos antioxidantes e reestabelecimento da homeostase em locais de lesão (OHYAMA; VERAITCH, 2013). Em um trabalho anterior do grupo de pesquisa do LACERT foi demonstrado a presença e viabilidade de CTM isoladas do tecido dérmico, sendo o seu fenótipo semelhante as CTM da medula óssea e viabilidade em até 20 passagens em cultura. Esse estudo também demonstrou que as CTM aceleram o reparo de feridas cutâneas, através do recrutamento de células inflamatórias, estimulam a vascularização, o depósito de colágeno, a re-epitelização e modulam a expressão de diferentes genes relacionados com o reparo tecidual (JEREMIAS, 2013).

Tendo em vista estes efeitos no reparo cutâneo, neste trabalho foi investigado o efeito do secretoma de CTM da derme no crescimento dos pelos. Pela análise dos resultados, foi possível confirmar a eficácia do secretoma de CTM da derme como um agente promotor do crescimento dos pelos e um promissor tratamento para a perda de pelos com base em estudos *in vivo*.

A perda e a regressão do cabelo são problemas comuns na dermatologia clínica (GORDON; GORDON; TOSTI, 2011). Esta patologia é ainda mais crítica em pacientes com problemas de obesidade, estes apresentam dificuldades no processo de regeneração cutânea e dos pelos (WONG *et al.*, 2012), não tendo no mercado alternativas seguras para este público até o momento. Um exemplo é o Minoxidil®, amplamente utilizado no tratamento da queda de cabelo mas com eficácia controversa, além de possuir o efeito colateral de rápido aumento de

peso que pode levar à obesidade do paciente (SAKR *et al.*, 2013). O estudo randomizado e controlado de 32 pacientes com alopecia androgenética tratados com aplicação tópica de Minoxidil 2% durante 14 semanas, reportou que houve aumento de peso em 90% dos pacientes variando de 0,7 a 7,7 kg com média geral de 3,5 kg (SAKR *et al.*, 2013). No presente estudo, os resultados obtidos mostraram que há um grande aumento de peso dos animais tratados com minoxidil®. Além disso, foi observado que o tratamento com secretoma e o veículo, afetam também o peso dos animais, indicando que estes tratamentos estimulam o ganho de peso. Não se sabe como o Minoxidil® tem influência no ganho de peso, mas nossos dados mostram que os outros tratamentos também afetaram o peso. Isto pode indicar que as alterações no ciclo do FP podem estar interligadas com o ganho de peso ou questões metabólicas extrínsecas, como influências ambientais de variações sazonais e de temperatura.

Vários modelos animais já foram utilizados experimentalmente para avaliar a extensão do crescimento do pelo. Muitos trabalhos relatam a utilização de camundongos da linhagem C57BL/6 como o melhor modelo na avaliação do crescimento do pelo (ZHANG *et al.*, 2016b)(YOON; AL-REZA; KANG, 2010), já que a estrutura dos ciclos do FP humano e de camundongos são semelhantes e a cor escura dos pelos facilita a visualização do crescimento. Assim, o camundongo desta linhagem valida-se como um importante modelo para estudos de regulação e ciclagem do FP em um curto período de tempo (em torno de 3 semanas).

A regeneração do FP é um complexo processo cíclico (JEONG *et al.*, 2008) de remodelamento do tecido que envolve fatores de crescimento, citocinas, hormônios, enzimas e moléculas de adesão. A ciclagem entre as fases anágena e telógena é regulada com precisão pelas células da papila dérmica, através de vias de sinalização que ativam a morfogênese do cabelo (DONG *et al.*, 2015). Os resultados obtidos demonstraram que o secretoma de CTM derivadas da derme promove o crescimento mais rápido dos pelos, sendo semelhante ao efeito do minoxidil®. Este crescimento acelerado indica um efeito do secretoma e do minoxidil® no ciclo do FP, ou seja, os tratamentos induzem mais rapidamente a progressão da fase telógena (repouso) para a anágena (crescimento). Diferentemente, os animais do grupo naïve e veículo tiveram um atraso no crescimento dos pelos, demonstrado pela maior área com score 0, o que indica uma retenção ou prolongamento da fase telógena. O trabalho de Dong *et al.* revelou que o secretoma de CTM da medula óssea induz o crescimento completo do pelo dos camundongos em 14 dias (DONG *et al.*, 2015), mostrando que o tratamento acelera a progressão da fase telógena para a anágena. O estudo de Won *et al.* (2017) utilizando meio condicionado de CTM do tecido adiposo também demonstrou a indução da fase anágena, promovendo o crescimento do pelo em camundongos e o alongamento do eixo do cabelo em culturas *ex vivo* de FP humano

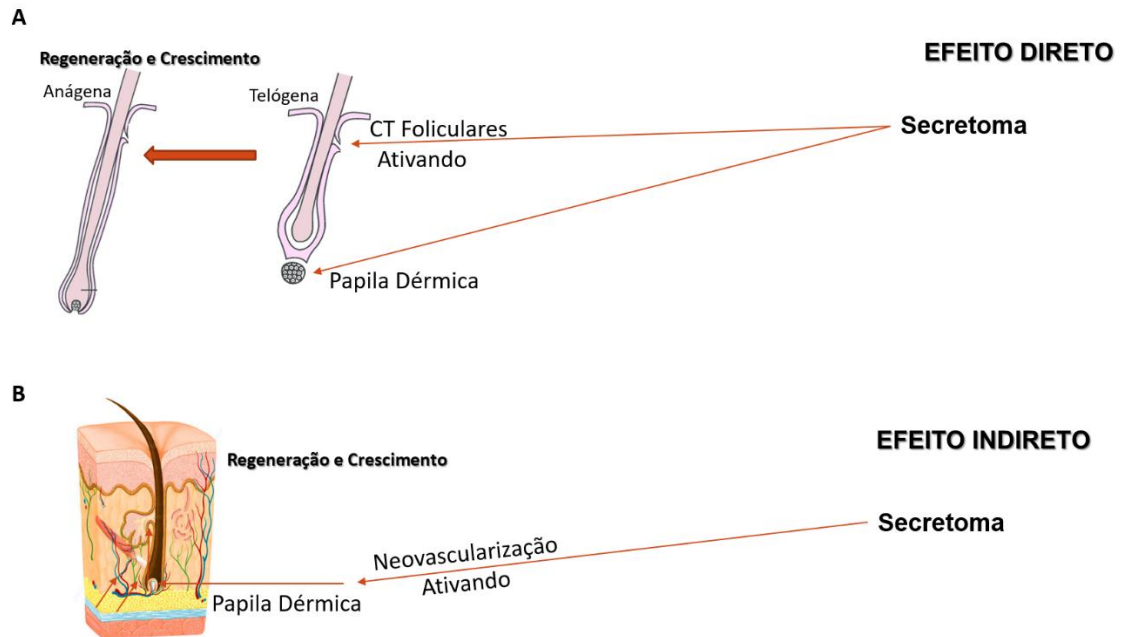
(WON *et al.*, 2017). No ensaio clínico de Shin *et al.* também foi utilizado meio condicionado de CTM do tecido adiposo, o qual se demonstrou uma promissora estratégia terapêutica no tratamento da alopecia androgenética (SHIN; WON; PARK, 2017).

Além de acelerar o crescimento dos pelos, os dados obtidos mostraram que o tratamento com o secretoma de CTM da derme também aumenta o peso e o tamanho dos pelos. No caso do aumento do peso, este pode indicar que há uma maior quantidade de pelos, ou até mesmo um aumento no comprimento e espessura dos mesmos. De fato, os resultados mostram que o comprimento dos pelos após o tratamento aumenta, inclusive quando comparado ao Minoxidil®. Foi observado o maior comprimento dos pelos em animais tratados com secretoma de CTM, com valor médio de 7,8 mm, sendo maiores em comprimento que o valor médio de 7,1 mm dos tratados com Minoxidil®. O trabalho de Zhang *et al.* avaliou o comprimento de pelos em animais tratados com uma substância a base de cedrol e , apesar dos resultados com cedrol terem sido favoráveis, o Minoxidil 2% ainda se mostrou como o melhor tratamento, se desconsiderados seus efeitos colaterais (ZHANG *et al.*, 2016b). Os trabalhos que avaliaram o efeito do secretoma de CTM de outras fontes (medula e tecido adiposo) não utilizaram o Minoxidil® como controle positivo, o que torna os resultados obtidos neste estudo ainda mais relevantes para a literatura e promissores em relação a aplicação terapêutica. Acrescenta-se ainda que análises histológicas serão realizadas para avaliar se o tratamento afeta a quantidade de folículo e verificar a progressão da fase telógena para anágena.

Acredita-se que a maior habilidade das CTM seja a capacidade de alterar o microambiente tecidual a partir da secreção de fatores tróficos (D'SOUZA *et al.*, 2015) e regular células integrantes do nicho via sinalização parácrina (JI *et al.*, 2017). Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, formulou-se duas hipóteses sobre o mecanismo de ação do secretoma das CTM da derme no crescimento do FP: (1) o efeito parácrino dos fatores presentes no secretoma poderiam modificar o macro e microambiente do FP (Figura 13B); (2) a ação direta dos fatores do secretoma sobre as células foliculares (Figura 13A).

Figura 13 - Hipóteses sobre o mecanismo de ação do secretoma das CTM

(A) Efeito Direto e (B) Efeito Indireto do secretoma das CTM da derme no crescimento do FP.



Fonte: A autora (2017).

Para entender a influência do microambiente sobre o crescimento do pelo, o trabalho de Yano *et al.* mostrou que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) incorporado a um hidrogel de colágeno acelera a entrada do FP na fase anágena e aumenta o comprimento do cabelo quando implantado de forma subcutânea no dorso de camundongos. O estudo demonstrou que o VEGF pode promover o crescimento do FP através da angiogênese induzida (YANO; BROWN; DETMAR, 2001). Estudos anteriores também demonstraram que a alteração do microambiente de células da papila dérmica pode levar à perda de cabelo, como na alopecia androgenética e a perda de cabelo quimicamente induzida (RAMOS; GUERRERO-JUAREZ; PLIKUS, 2013).

Considerando os fatores liberados pelas CTM, análises do secretoma de CTM derivadas da medula óssea e tecido adiposo revelaram a expressão dos fatores de crescimento: epidérmico (EGF), endotelial vascular α (VEGF- α) e de queratinócitos (KGF), fibroblastos 2 (FGF-2), semelhante a insulina-1 (IGF-1), a interleucina 6 (IL-6), a angiopoietina-1 e o indutor angiogênico rico em cisteína 61 (Cyr61) (RANGANATH *et al.*, 2012)(CHEN *et al.*, 2008). Vários desses fatores presentes no secretoma das CTM estão envolvidos com o reparo tecidual, e acredita-se serem os responsáveis por promover a regeneração do folículo piloso. Por exemplo, o EGF atua na proliferação e migração de células foliculares (ZHANG *et al.*, 2016a),

bem como, promove a progressão do ciclo celular de CTFP (BAI *et al.*, 2017). Assim como o IGF, que também regula a proliferação e migração celular durante o desenvolvimento do folículo piloso (SU *et al.*, 2017). Yeon *et al.* sugere que o IGF-1 prolonga a fase anágena de crescimento no ciclo do folículo piloso. O seu trabalho avaliou o efeito do hidrolisado de placenta humana acrescido com IGF-1 e aminoácidos sobre o crescimento dos pelos, como resultado foi observado o maior crescimento dos pelos em número e tamanho (YEON A NO *et al.*, 2015). Estes estudos confirmam a influência de fatores que agem diretamente sobre as células foliculares, desta forma, observa-se a seletiva regulação celular na proliferação, diferenciação e consequente ativação dos ciclos e crescimento do FP.

Além disso, estudo recente mostrou que o secretoma de CTM da medula óssea promoveu a progressão do ciclo celular e induziu a regeneração do cabelo pela via de sinalização Wnt/ β -catenina em camundongos, e que o tratamento com o secretoma de CTMs com superexpressão de Wnt resulta em um crescimento ainda mais rápido e em maior quantidade de pelos. A sinalização de Wnt é uma das vias responsáveis por iniciar a morfogênese e diferenciação das células foliculares e também os ciclos de regeneração do folículo piloso. Alterações na sinalização Wnt podem manter o *pool* de CT e progenitores e regular a diferenciação de linhagens comprometidas. Portanto, a mudança seletiva na via de sinalização Wnt pode ser um alvo útil para a terapia celular (DONG *et al.*, 2015).

A análise acurada dos fatores presentes no secretoma de CTM da derme é uma das perspectivas desse estudo. Partindo do conhecimento das moléculas envolvidas no processo de regeneração e crescimento do FP é possível entender a sua biologia, bem como, o seu mecanismo de ação sobre o crescimento capilar.

7. CONCLUSÃO

Em resumo, o secretoma das CTM da derme induziu a progressão da fase telógena para anágena, resultando em crescimento mais rápido do pelo, além de promover significativamente um aumento do comprimento e peso do pelo, que pode indicar uma maior quantidade de pelos. De acordo com os resultados, o efeito do secretoma das CTM da derme no crescimento do pelo foi semelhante e, até mesmo, superior ao minoxidil em algumas análises, sendo este um fármaco já estabelecido no mercado para o tratamento da calvície e queda de cabelo. Porém, o minoxidil apresenta diversos efeitos adversos em homens e mulheres o que o compromete a sua utilização. Os dados obtidos aqui, mostram que o tratamento com o secretoma atua de forma eficiente no crescimento do pelo, tendo potencial para ser utilizado como um método terapêutico alternativo para o tratamento de alopecias.

REFERÊNCIAS

- ALDHALIMI, M. A.; HADI, N. R.; GHAFIL, F. A. Promotive Effect of Topical Ketoconazole, Minoxidil, and Minoxidil with Tretinoin on Hair Growth in Male Mice. **ISRN Pharmacology**, v. 2014, p. 1–5, 2014.
- ALONSO, L. The hair cycle. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 3, p. 391–393, 2006.
- ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100 Suppl, p. 11830–11835, 2003.
- ARCA, E. et al. An open, randomized, comparative study of oral finasteride and 5% topical minoxidil in male androgenetic alopecia. **Dermatology**, v. 209, n. 2, p. 117–125, 2004.
- BAI, T. et al. Epidermal Growth Factor Induces Proliferation of Hair Follicle-Derived Mesenchymal Stem Cells Through Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Activation of ERK and AKT Signaling Pathways Associated with Upregulation of Cyclin D1 and Downregulation of p1. **Stem Cells and Development**, v. 26, n. 2, p. 113–122, 2017.
- BALANÁ, M. E. Epidermal stem cells and skin tissue engineering in hair follicle regeneration. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 4, p. 711, 2015.
- BLANPAIN, C. et al. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. **Cell**, v. 118, n. 5, p. 635–648, 2004.
- BOISVERT, W. A. et al. Hair growth-promoting effect of Geranium sibiricum extract in human dermal papilla cells and C57BL/6 mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 109, 2017.
- CAO, W. et al. Aging hair follicles rejuvenated by transplantation to a young subcutaneous environment. **Cell Cycle**, v. 15, n. 8, p. 1093–1098, 2016.
- CHACÓN-MARTÍNEZ, C. A. et al. Hair follicle stem cell cultures reveal self-organizing plasticity of stem cells and their progeny. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 2, p. 151–164, 2017.
- CHAMBERLAIN, G. et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.
- CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, 2008.
- CHUONG, C.-M. et al. Physiological regeneration of skin appendages and implications for regenerative medicine. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 27, n. 2, p. 61–72, 2012.
- D'SOUZA, N. et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 186, 2015.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 8, p. 875–884, 2000.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

- DONG, L. et al. Treatment of MSCs with Wnt1a-conditioned medium activates DP cells and promotes hair follicle regrowth. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 5432, 2015.
- ELISSEEFF, J. et al. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 8, n. 3, p. 150–161, 2005.
- EVERTS, H. B. Endogenous retinoids in the hair follicle and sebaceous gland. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 1, p. 222–229, 2012.
- FUCHS, E. Scratching the surface of skin development. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 834–842, 2007.
- GILBERT, S. F. The emergence of the ectoderm: The central nervous system and the epidermis. In: **Developmental biology**. 9th. ed. Sunderland, MA: Sinauer, 2010. p. 365–371.
- GORDON, K.; GORDON, K.; TOSTI, A. Alopecia: evaluation and treatment. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 4, p. 101, jul. 2011.
- GUPTA, A.; FOLEY, K. **5% Minoxidil: treatment for female pattern hair loss**. [s.l.: s.n.]. v. 19
- HABIF, T. P. Skin Anatomy. In: **Clinical Dermatology: A Color Guide to Diagnosis and Therapy**. 6th Editio ed. Hanover, USA: Elsevier Ltd, 2016. p. 1064.
- HSU, Y.-C.; LI, L.; FUCHS, E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. **Nature Medicine**, v. 20, n. 8, p. 847–856, 2014.
- HUNT, N.; MCHALE, S. The psychological impact of alopecia. **Psychologist**, v. 20, n. 6, p. 362–364, 2007.
- JEONG, C. et al. Immunohistochemical Study on the Hair Growth Promoting Effect of Yonnyuniksoogobon-dan. **The Journal of Korean Oriental Medicine Original**, v. 29, n. 5, 2008.
- JEREMIAS, T. DA S. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA PELE NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS**. [s.l.] Federal University of Santa Catarina, 2013.
- Jl, J. et al. Aging in hair follicle stem cells and niche microenvironment. **Journal of Dermatology**, n. January, p. 1–8, 2017.
- JIMURA, N. et al. Alopecia areata complicated with Good's syndrome. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 1, p. 6–7, 2017.
- KATSUDA, T. et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Proteomics**, v. 13, n. 10–11, p. 1637–1653, 2013.
- LIYANAGE, D.; SINCLAIR, R. Telogen Effluvium. **Cosmetics**, v. 3, n. 2, p. 13, 2016.
- MESSENGER AG, R. J. Minoxidil: mechanism of action on hair growth. **Br J Dermatol**, n. 150, p. 186–94, 2004.
- MOHAMMADI, P. et al. Human Hair Reconstruction: Close but Yet So Far. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 23, p. scd.2016.0137, 2016.
- NALLURI, R.; HARRIES, M. Alopecia in general medicine. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 16, n. 1, p. 74–78, 2016.

- NAMAZI, M. R. M. D. Prostaglandin analogs for hair growth: Greater expectations. **Dermatology Online Journal**, v. 9, n. 5, 2003.
- NICKEL, W.; RABOUILLE, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 148–155, 2009.
- OH, J. Y.; PARK, M. A.; KIM, Y. C. Peppermint oil promotes hair growth without toxic signs. **Toxicological Research**, v. 30, n. 4, p. 297–304, 2014.
- OHYAMA, M.; VERAITCH, O. Strategies to enhance epithelial-mesenchymal interactions for human hair follicle bioengineering. **Journal of Dermatological Science**, v. 70, n. 2, p. 78–87, 2013.
- OSORIO, K. M. et al. Runx1 modulates developmental, but not injury-driven, hair follicle stem cell activation. **Development**, v. 135, n. 6, p. 1059–1068, 2008.
- OTBERG, N. et al. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 1, p. 14–19, 2004.
- QI, J.; GARZA, L. A. An Overview of Alopecias. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 3, p. a013615–a013615, 1 mar. 2014.
- RAMOS, R.; GUERRERO-JUAREZ, C. F.; PLIKUS, M. V. Hair Follicle Signaling Networks: A Dermal Papilla–Centric Approach. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 10, p. 2306–2308, 2013.
- RANGANATH, S. H. et al. Harnessing the Mesenchymal Stem Cell Secretome for the Treatment of Cardiovascular Disease. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 3, p. 244–258, mar. 2012.
- SAKR, F. M. et al. Preparation and evaluation of a multimodal minoxidil microemulsion versus minoxidil alone in the treatment of androgenic alopecia of mixed etiology: a pilot study. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 413–423, 2013.
- SANDERS, R. C. et al. Stem cell research. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 7, n. 2, p. 135–140, 2006.
- SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1075–1079, 2006.
- SCHLAKE, T. Determination of hair structure and shape. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 18, n. 2, p. 267–273, 2007.
- SCHMIDT-ULLRICH, R.; PAUS, R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. **BioEssays**, v. 27, n. 3, p. 247–261, 2005.
- SHAH, K. et al. A comparative study of microneedling with platelet-rich plasma plus topical minoxidil (5%) and topical minoxidil (5%) alone in androgenetic alopecia. **International Journal of Trichology**, v. 9, n. 1, p. 14–18, 1 jan. 2017.
- SHIN, H.; WON, C. H.; PARK*, W.-K. C. AND B.-S. **Up-to-date Clinical Trials of Hair Regeneration Using Conditioned Media of Adipose-Derived Stem Cells in Male and Female Pattern Hair Loss** *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/152154/article>>
- SU, Y. S. et al. Icaritin promotes mouse hair follicle growth by increasing insulin-like growth factor 1 expression in dermal papillary cells. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 287–294, 2017.

TRAN, C. Stem Cells as Drug Delivery Methods: Application of Stem Cell Secretome for Regeneration. p. 1–11, 2015.

TUMBAR, T. et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5656, p. 359–63, 2004.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 2, p. 1–18, 2015.

WON*, C. H. et al. **The Basic Mechanism of Hair Growth Stimulation by Adipose-derived Stem Cells and Their Secretory Factors** *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/155280/article>>

WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, 2012.

YANO, K.; BROWN, L. F.; DETMAR, M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 4, p. 409–417, 2001.

YEON A NO, TAE-RIN KWON, HYE MIN PARK, HAE JUNG HAN, HYI JEONG JI, Y.-J. H. AND B. J. K. A Hair Growth-Enhancing Component of Hydrolysate of Human Placenta: In vitro and In vivo Assessments. **Journal of Clinical and Investigative Dermatology**, v. 3, n. 1, p. 3–7, 2015.

YOON, J. I.; AL-REZA, S. M.; KANG, S. C. Hair growth promoting effect of Zizyphus jujuba essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1350–1354, 2010.

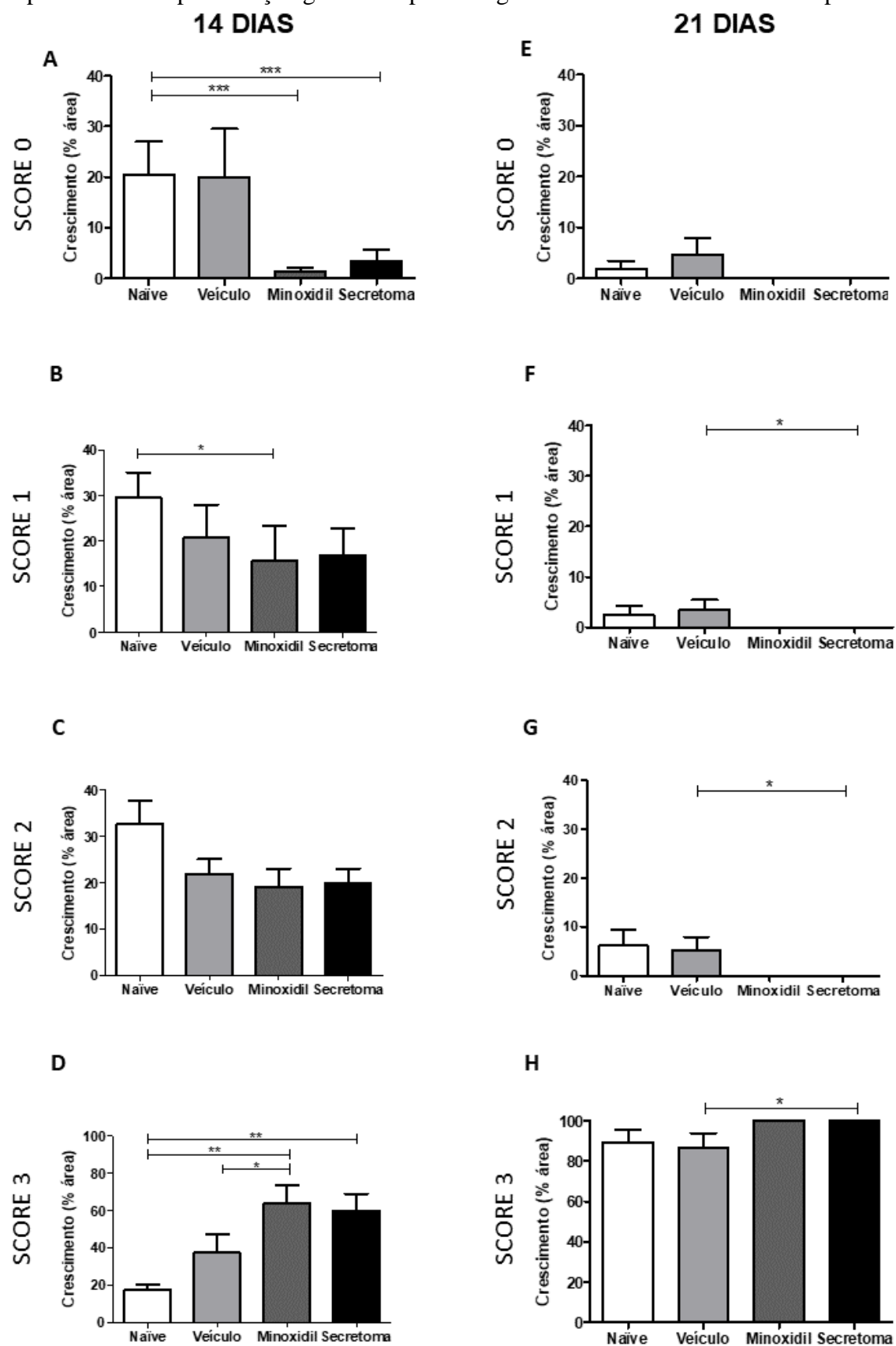
ZHANG, H. et al. Epidermal Growth Factor Promotes Proliferation and Migration of Follicular Outer Root Sheath Cells via Wnt/ β -Catenin Signaling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 360–370, 2016a.

ZHANG, Y. et al. Hair growth promoting activity of cedrol isolated from the leaves of *Platycladus orientalis*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 641–647, 2016b.

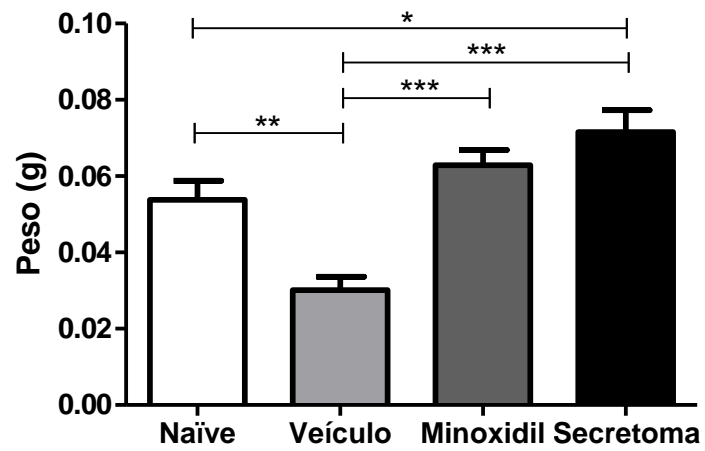
ZHU, K. et al. Hairless controls hair fate decision via Wnt/ β -catenin signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 3, p. 567–570, 2017.

APÊNDICES

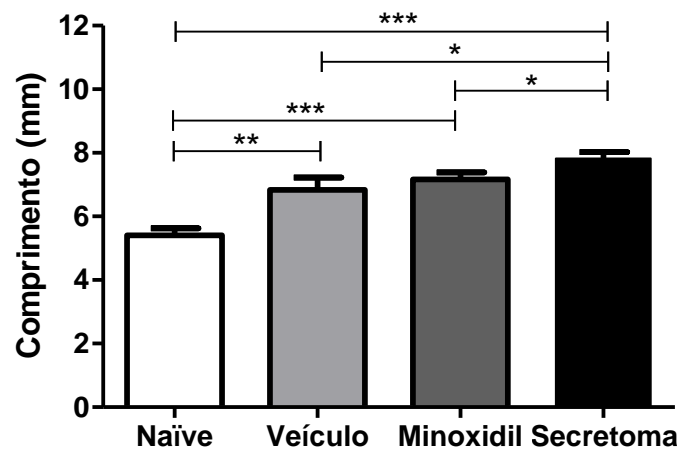
Apêndice 1 – Representação gráfica da porcentagem da área de crescimento dos pelos.



Apêndice 2 – Representação gráfica do peso dos pelos



Apêndice 3 – Representação gráfica do comprimento dos pelos



ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
DEP. DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA – BEG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Ação do secretoma de células-tronco mesenquimais na manutenção do folículo piloso em modelo murino”.

Pesquisador responsável: Prof. Dra. Andrea Trentin, RG: 45181543.

Pesquisador participante: Talita da Silva Jeremias.

Telefone para contato: (48) 3721-4582.

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Ação do secretoma de células-tronco mesenquimais na manutenção do folículo piloso em modelo murino”, de responsabilidade da pesquisadora Prof. Dra. Andrea Trentin. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 3721-4582.

Declaramos que as normas da Resolução 466/CONEP e suas complementares serão obedecidas em todas as fases da pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo realizar a cultura em laboratório de células tronco derivadas da sua pele e/ou do seu tecido adiposo. Este estudo é necessário porque as mais variadas pesquisas podem ser realizadas in vitro com essas células, levando ao esclarecimento de muitas questões científicas e ao desenvolvimento de novas terapias.

Serão utilizados os pedaços de pele e/ou tecido adiposo subcutâneo que sobram das cirurgias plásticas. Isto não traz riscos, pois esses pequenos fragmentos que sobram

normalmente são jogados fora (lixo hospitalar). A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células-tronco da pele e tecido adiposo. Este estudo pretende avaliar o potencial de crescimento dos pelos de camundongos tratados com o secretoma de células-tronco derivadas da pele. Estudos como estes são necessários, pois nos proporcionam conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias utilizando células-tronco, como por exemplo, na reconstituição funcional da nova pele em casos de queimaduras. Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos experimentais em laboratório.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele e/ou tecido adiposo retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador:

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, RG _____, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Estudo comparativo do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais derivadas da derme e do tecido adiposo humanos e seus meios condicionados associados a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo”.

Assinatura do paciente ou responsável:

ANEXO 2 – Certificado CEUA



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas e regeneração do folículo piloso em modelo de camundongos *mus musculus* C57Bl/6", protocolada sob o CEUA nº 3836211016, sob a responsabilidade de **Andréa Gonçalves Trentin e equipe; Adriane Cristina Fagundes ; Diana Heck; Gabriel Trajano Petri; Helena Debiazi Zomer; Juliano Tibola; Maiara Marques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 13/03/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of cutaneous wound healing and hair follicle regenerations in mouse model *mus musculus* C57Bl/6", utilizing 1506 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 3836211016, under the responsibility of **Andréa Gonçalves Trentin and team; Adriane Cristina Fagundes ; Diana Heck; Gabriel Trajano Petri; Helena Debiazi Zomer; Juliano Tibola; Maiara Marques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 03/13/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2016** a **11/2020**

Área: **Beg (Biologia Celular, Embriologia E Genética)**

Origem:	CCB - Biotério de Biologia Celular			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade: 4 a 6 meses N: 1080
Linhagem:	C57BL/6		Peso: 20 a 30 g	
Origem:	CCB - Biotério de Biologia Celular			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade: 1 a 2 meses N: 330
Linhagem:	C57BL/6		Peso: 10 a 20 g	
Origem:	CCB - Biotério de Biologia Celular			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade: 6 a 8 semanas N: 96
Linhagem:	C57BL/6		Peso: 10 a 20 g	

Resumo: A engenharia tecidual é uma possibilidade viável para o tratamento de uma série de lesões e doenças até então sem cura. Outra alternativa viável é a terapia celular baseada na utilização de fontes acessíveis e autólogas de células ou elementos celulares, como a pele e o tecido adiposo. Destaca-se ainda que a queimadura é um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Apesar do desenvolvimento experimental e clínico de modelos de regeneração dérmica e de cultura de células, ainda não se obteve uma cobertura ideal. Assim, há necessidade de se desenvolver novos materiais e procedimentos terapêuticos. Em estudo anterior, desenvolvemos métodos de cultivo de células-tronco de folículos piloso em modelos murino e humano. Demonstramos que o folículo piloso humano abriga diversas populações de células-tronco com amplo potencial de diferenciação celular e assim corresponde a uma possível e importante fonte autóloga para terapia celular. Desenvolvemos ainda método de cultivo de células-tronco mesenquimais (ou estromais mesenquimais) a partir da pele (derme) (do inglês dermal stromal cells, DSC) e de tecido adiposo (do inglês adipocyte stromal cells, ASC) humanos. As DSC se integram em matrizes de regeneração dérmica (MRD) de uso clínico apresentando alta sobrevida. Estabelecemos ainda modelo pré-clínico de reparo cutâneo em camundongos. Os resultados apontam para maior eficiência e rapidez nesse processo com o uso associado das DSC e MRD. Neste projeto iremos dar continuidade ao estudo anterior, avaliando o uso de elementos da terapia celular (células e produtos derivados como fatores secretados e vesículas extracelulares/exossomos) e engenharia de tecidos no reparo de feridas cutâneas e na manutenção de folículos pilosos, envolvendo ensaios de cultura de células, pré-clínicos e clínicos. É importante destacar que as MRD usadas atualmente na clínica para tratamento dos pacientes grandes queimados apresentam um custo muito elevado para o SUS. Desse modo, pretendemos ainda avaliar o uso de outros biomateriais, potencialmente mais baratos como hidrogéis de celulose bacteriana e uma fonte de fatores solúveis - PRP. É meta do projeto produzir conhecimentos, desenvolver e avaliar tecnologias com grande potencial de aplicabilidade ao SUS de modo a proporcionar recuperação mais rápida e redução dos custos hospitalares do paciente queimado.



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Local do experimento: Biotério Setorial de Biologia Celular e LACERT

Florianópolis, 01 de novembro de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina